C.N.R.S.
AO 12042

THESE

DE DOCTORAT D'ETAT
ES SCIENCES NATURELLES

présentée

A L'UNIVERSITE PARIS VI

par Monsieur Jean-Marie GASC

pour obtenir
le grade de Docteur Es-Sciences

ETUDE QUANTITATIVE DE QUELQUES ASPECTS DE LA CROISSANCE AU COURS DE LA DIFFERENCIATION SEXUELLE DES EMBRYONS D'OISEAUX (POULET ET CANARD).

Soutenue le 21 Janvier 1976 devant la Commission d'Examen

Président : M. L. GALLIEN

Examinateurs : M. Et. WOLFF

Mme N. LE DOUARIN

M. A. COLLENOT

M. R. DUBOIS

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548114_0006

C.N.R.S.
AO 12042

THESE

DE DOCTORAT D'ETAT ES SCIENCES NATURELLES

présentée

A L' UNIVERSITE PARIS VI

par Monsieur Jean-Marie GASC

pour obtenir
le grade de Docteur Es-Sciences

ETUDE QUANTITATIVE DE QUELQUES ASPECTS DE LA CROISSANCE AU COURS DE LA DIFFERENCIATION SEXUELLE DES EMBRYONS D'OISEAUX (POULET ET CANARD).

Soutenue le 21 Janvier 1976 devant la Commission d'Examen

Président : M. L. GALLIEN

Examinateurs : M. Et. WOLFF

Mme N. LE DOUARIN

M. A. COLLENOT

M. R. DUBOIS

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

SOMMAIRE

INTRODUCTION.....1

MATERIEL ET TECHNIQUES.

A- Animaux utilisés - Conditions d'incubation - Chronologie du développement.....3

B - Dosage de protéines et d'ADN dans les embryons.....5

C - Dosage de protéines et d'ADN dans les gonades.....6

D - Culture des gonades.....7

E - Marquage des gonades dans l'oeuf.....11

F - Mesure de la radioactivité sur coupes.....13

G - Calculs statistiques.....15

H - Identification précoce du sexe génotypique des embryons.....16

a) Description de la technique.....17

b) Description du caryotype.....18

c) Utilisation des caryogrammes pour l'identification du sexe.....22

PREMIERE PARTIE : CROISSANCE CORPORELLE DES EMBRYONS DE POULET ET DE CANARD.....24

I -- CROISSANCE DES EMBRYONS DE POULET

Résultats.....26

Discussion.....30

II -- CROISSANCE DES EMBRYONS DE CANARD

Résultats.....33

Discussion.....36

III -- CONCLUSION.....43

DEUXIEME PARTIE : CROISSANCE DES GONADES DE POULET ET DE CANARD...45

I -- CROISSANCE DES GONADES DE POULET.....

A - Résultats.....46

1. Protéines.....46

2. ADN.....52

B - Discussion.....55

II -- CROISSANCE DES GONADES DE CANARD

A - Résultats.....58

1. Protéines.....58

2. ADN.....60

B - Discussion.....64

III -- CROISSANCE RELATIVE DU CORPS ET DES GONADES DE L'EMBRYON DE POULET ET DE CANARD.....66

A. - Poulet.....67

B. - Canard.....68

C. - Discussion - Conclusion.....70

TROISIEME PARTIE : SYNTHESE D'ADN DANS LES GONADES DES EMBRYONS DE POULET ET DE CANARD PENDANT LA DIFFERENTIATION SEXUELLE.....73

I - SYNTHESE D'ADN DANS LES GONADES DE POULET.....75

A. - Résultats.....77

1. Mesure de la ^{3}HTdr incorporée dans les gonades.....77

2. Incorporation de ^{3}HTdr rapportée à la quantité de protéines.....80

3. Incorporation de ^{3}HTdr rapportée à la quantité d'ADN.82

B. - Interprétation et discussion des résultats.....84

II - SYNTHESE D'ADN DANS LES GONADES DE CANARD.....88

A.- Résultats.....90

1. Mesure de ^{3}HTdr incorporée dans les gonades.....90

2. Incorporation de ^{3}HTdr rapportée à la quantité de protéines.....92

3. Incorporation de ^{3}HTdr rapportée à la quantité d'ADN.94

B. Interprétation et discussion des résultats.....96

III. CONCLUSION.....100

QUATRIEME PARTIE

INTRODUCTION.....104

I - MESURE DE LA SYNTHESE D'ADN.....105

A. - Mesure du marquage effectuée sur toute la surface des coupes.108

Gonades de Poulet.....108

Gonades de Canard.....111

B. - Mesure du marquage effectuée séparément sur les zones corticale et médullaire.....112

1 - Cx D / Cx G.....112

2 - Md D / Md G.....114

3 - Cx D / Md D.....115

4 - Cx G / Md G.....117

C. - Interprétation et discussion.....117

II. LOCALISATION DE LA SYNTHESE D'ADN DANS LES GONADES.....121

1 - Embryons de 4 1/2 jours.....123

2 - Embryons de 5 jours.....125

3 - Embryons de 6 jours.....127

III. CROISSANCE ET HISTOGENESE DES GONADES ENTRE 4 1/2 ET 6 JOURS.128

CONCLUSION GENERALE ET DISCUSSION.....135

RESUME.....141

BIBLIOGRAPHIE.....147

AVANT-PROPOS

Cette thèse a été préparée au Laboratoire d'Embryologie expérimentale du Collège de France. Monsieur le Professeur Etienne WOLFF, membre de l'Institut m'y a accueilli avec bienveillance parmi ses collaborateurs, m'a confié un sujet de recherche, m'a guidé et encouragé dans mon travail. L'avantage précieux de ses conseils et de son aide s'est trouvé renforcé par la richesse scientifique de son Laboratoire. Je lui exprime avec plaisir ma vive gratitude pour le temps qu'il m'a consacré malgré ses nombreuses occupations, et pour le climat de travail très favorable dont j'ai bénéficié grâce à lui. Je tiens à associer Mdame WOLFF à cet hommage, pour la sollicitude bienveillante qu'elle m'a constamment manifestéependant la réalisation de ce travail.

Monsieur le Professeur Louis GALLIEN, membre de l'Institut, me fait l'honneur de participer à mon jury, après m'avoir enseigné l'Embryologie il y a quelques années. Je tiens à lui exprimer ma reconnaissance pour avoir accepté de critiquer mon travail et pour la formation si riche et si intéressante que j'ai reçue dans son Laboratoire lorsque j'étais étudiant.

Je tiens à remercier Madame Nicole LE DOUARIN, nouveau directeur du Laboratoire d'Embryologie, de l'intérêt qu'elle me porte en participant à mon jury de thèse. Je lui exprime ma reconnaissance pour ses critiques et ses remarques.

Je remercie Monsieur Alain COLLENOT, Professeur à l'Université de Paris VI, de l'attention avec laquelle il a examiné mon travail et des observations qu'il m'a faites à ce sujet. Je lui exprime ma gratitude pour sa présence dans mon jury.

Régis DUBOIS, Sous-Directeur de Laboratoire au Collège de France, a connu les étapes de mon travail. Dans le doute ou le désappointement il m'a conseillé et aidé. Ses suggestions ont stimulé ma curiosité et ses critiques m'ont obligé à plus de rigueur. Avec plaisir je lui adresse mes remerciements.

Qu'il me soit permis d'évoquer maintenant la mémoire de Jean-Michel KIRRMANN. Des quelques mois pendant lesquels j'ai travaillé près de lui je garde le souvenir précieux de sa bonté et de son intelligence Il aimait la simplicité et en avait fait une vertu de travail. La discrétion et l'opportunité de ses conseils faisait pour moi l'attrait de nos rencontres. La sympathie de son accueil et la spontanéité de son dévouement s'exerçaient pour tous. J'en ai bénéficié, malgré des circonstances pénibles, et je tiens à rendre hommage à sa mémoire.

Enfin, il m'est agréable de remercier mes collègues de travail, techniciens et chercheurs, pour leur concours dans la réalisation de cette thèse. J'ai bénéficié de leur aide et j'ai apprécié la qualité de leur participation.

"La différenciation est l'un des problèmes clefs de la Biologie. C'est vers sa solution que tendent un grand nombre de disciplines, l'embryologie, l'histologie, la cytologie, la biochimie, la physiologie, la génétique, la cancérologie, etc. Car la différenciation a plusieurs aspects. Les uns correspondent à la différenciation morphologique, considérée aux différents niveaux d'organisation, les autres à la formation de molécules nouvelles, aux débuts d'une activité fonctionnelle, au déclenchement ou au dérèglement de ces propriétés." Et. WOLFF (1966).

I N T R O D U C T I O N

Parmi les signes précoces qui, chez les oiseaux, permettent de distinguer le sexe des embryons, le degré d'asymétrie morphologique des gonades est le plus simplement accessible à l'observation. Chez le Poulet cette différence se manifeste pendant le 8ème jour, lorsque les ovaires deviennent sensiblement plus asymétriques que les testicules. Ce caractère sexuel, complèté par son corollaire, la structure histologique des gonades, est généralement considéré comme le signe de l'accomplissement de la différenciation sexuelle des gonades. L'intérêt porté à cet aspect de la différenciation est justifié par la facilité de son observation, mais aussi par l'importance des causes dont il dépend. En effet, à partir d'ébauches gonadiques déjà asymétriques aux premiers stades de leur formation, ce degré

d'asymétrie morphologique est le résultat d'une croissance inégale, dépendant du sexe de l'embryon.

C'est à cette croissance des gonades, dont le rôle dans le développement est évident et dont les aspects liés à la différenciation sexuelle sont particulièrement importants, que nous avons consacré l'étude quantitative dont les résultats sont rassemblés dans cette thèse.

La mesure de la croissance des gonades par leur contenu en protéines et en ADN, et par le taux de synthèse d'ADN était notre premier objectif. Au cours de cette étude il nous est apparu que la croissance corporelle des embryons, que nous utilisions comme base pour l'estimation de la croissance des gonades, pouvait elle aussi dépendre du sexe.

C'est donc un ensemble de résultats quantitatifs portant sur l'embryon entier et sur ses gonades que nous présentons en vue d'établir ou de préciser les rapports entre la différenciation sexuelle et la croissance.

Ce travail a été réalisé parallèlement sur les embryons de Poulet et de Canard. Cette double étude a pour but de montrer la généralité des résultats obtenus et de mettre en relief certains caractères propres à l'une ou l'autre espèce dont la signification a un intérêt particulier dans le cadre de ce travail.

La partie expérimentale est limitée au Poulet et au Canard, et nous avons donc volontairement évité de dépasser le cadre de la classe des oiseaux dans la présentation, la discussion et la bibliographie de notre sujet.

MATERIEL ET TECHNIQUES

A - Animaux utilisés - Conditions d'incubation - Chronologie du développement.

Les recherches ont porté sur les embryons de deux espèces d'oiseaux : le Poulet et le Canard. Les oeufs de Poule (*Gallus domesticus*, race Leghorn blanche) proviennent d'un élevage avicole. Ceux de Cane (*Anas phatyrhyncos*, race Pékin blanche) sont produits au laboratoire par un élevage dont les animaux sont renouvelés deux fois par an.

Les oeufs sont incubés à 38,5°C en atmosphère humide. Ils sont placés dans la couveuse soit horizontalement soit verticalement la chambre à air vers le haut. L'incubation en position verticale est nécessaire dans le cas où l'identification précoce du sexe est pratiquée sur l'embryon (voir plus loin les détails de cette technique). Aucune conséquence de cette orientation de l'oeuf n'a été observée, et nous l'avons progressivement adoptée pour les embryons de tous les stades.

Tous les oeufs ont été soumis aux mêmes conditions d'incubation. Malgré cela il y a de grandes variations dans le développement des embryons de même âge : variations individuelles, saisonnières et probablement aussi dues aux couveuses.

Pour la chronologie du développement les tables de HAMBURGER et HAMILTON (1951) dans le cas du Poulet et de KOECKE (1958) pour le Canard ont été utilisées. La détermination précise du stade est d'au-

tant plus importante que les embryons sont plus jeunes, car les événements qui nous intéressent se succèdent alors à un rythme accéléré et doivent être datés avec exactitude. Pour les premiers stades étudiés chez le Poulet nous avons retenu la concordance suivante : stade 25 ⟷ 4,5 jours, stades 26 et 27 ⟷ 5 jours, stades 28 et 29 ⟷ 6 jours. Les écarts constatés autour des stades moyens sont parfois très grands et ils sont la cause de la dispersion de certains de nos résultats. Nous avons choisi de compenser ces écarts par le nombre élevé de mesures plutôt que par une limitation stricte et assez arbitraire du stade qui entraînerait une réduction du nombre de mesures. Seuls quelques cas extrêmes ont été éliminés.

Dans une série de résultats (voir le chapitre sur la synthèse de l'ADN dans les gonades de Poulet de 6 à 11 jours) nous avons réduit la dispersion des valeurs en regroupant celles-ci autour de moyennes qui correspondaient à des temps d'incubation différents de la durée réelle. Cette redistribution des mesures s'appuie sur l'observation des stades de développement morphologique à l'ouverture de l'oeuf et se justifie par une meilleure cohérence des résultats après cette modification.

Les résultats exposés portent le plus souvent sur les deux espèces animales utilisées dans ce travail. Il est donc important d'établir une chronologie parallèle de leur développement. Nous admettons que le Canard a un retard de développement d'une journée par rapport du Poulet. Pour les jeunes stades, nous pouvons préciser : Canard de 6 jours ⟷ Poulet de 4,5 à 5 jours (st.25-26), Canard de 7 jours ⟷ Poulet de 5,5 à 6 jours (st.27 à 29).

Enfin, pour éviter toute confusion, précisons que nous appelons 6ème jour l'intervalle de 5 à 6 jours d'incubation, et ainsi de suite pour tous les âges.

B - Dosage de protéines et d'ADN dans les embryons entiers.

Pour le dosage des protéines et de l'ADN dans le corps des embryons nous avons utilisé d'une part les animaux sur lesquels les gonades ont été prélevées, d'autre part des animaux préparés spécialement pour ces mesures. Ces deux provenances de matériel diffèrent seulement par l'ouverture des embryons et l'absence des gonades. Cette différence n'apparaît pas dans les mesures et nous n'en avons donc pas tenu compte dans la préparation des résultats.

Les embryons sont sortis de l'oeuf et congelés séparément ou par lots de 5 ou 7 animaux du même sexe. Les mesures effectuées sur des embryons pris un à un sont certaines séries de Poulet de 5 et 6 jours et de Canard de 6 et 7 jours. Toutes les autres mesures sont faites sur des lots de 7 (Poulet de 6 jours et Canard de 7 jours) ou de 5 embryons (stades plus âgés).

Après décongélation les corps des embryons sont broyés dans du Tyrode avec un broyeur à couteaux (Virtis 45) pendant 60 à 90 secondes à 30.000 Rpm environ. Une fraction de ce broyat est reprise dans un homogénéiseur en verre rôdé pour effectuer un second broyage plus fin que le premier. C'est ce broyat, éventuellement dilué par du tyrode qui est utilisé pour les dosages de protéines et d'ADN.

Les protéines sont dosées par la technique de LOWRY et coll. (1951) avec une gamme de Serum-albumine de Boeuf de 5 à 50 microgr.

L'ADN est dosé par la technique de BURTON (1956) avec une gamme d'ADN de thymus de Veau de 3 à 30 microgrammes. Les modifications suivantes ont été apportées à la technique originale : la précipitation à froid a été omise car la quantité de matériel non précipitable (nucléotides et oligonucléotides) est négligeable par rapport à celle d'ADN ; une seule hydrolyse a été pratiquée sur les broyats en milieu PCA à 5% pendant 20 minutes à 70°C. L'hydrolysat ainsi obtenu est refroidi et utilisé pour le dosage après élimination de la fraction sédimentable non hydrolysée. La quantité d'ADN dosée est rapportée à un embryon en tenant compte des dilutions successives pratiquées depuis la décongélation.

C - Dosage de protéines et d'ADN dans les gonades.

Les mesures de quantités de protéines et d'ADN contenues dans les gonades ont été faites soit sur des organes prélevés spécialement pour ces mesures, soit sur des organes mis en culture pendant 4 heures sur un milieu contenant de la thymidine tritiée (voir paragraphe D). Les résultats de ces deux séries ont été confondus car aucune différence sensible n'a été remarquée entre eux.

Les gonades sont prélevées en évitant toute contamination par le mésonéphros et toute perte de matériel, puis déposées sur un milieu standard (voir paragraphe D). Elles sont ensuite rassemblées par lots de 5 ou de 7 du même sexe en séparant les gonades droites des gonades gauches. Les lots ainsi constitués sont broyés dans 0,5 ml de Tyrode avec un petit homogénéiseur en verre rôdé. Une partie du broyat est utilisée pour le dosage des protéines (technique de LOWRY), une autre partie est congelée pour le dosage d'ADN

et, éventuellement, une partie sert à la mesure de la radioactivité incorporée (voir paragraphe D). Les fractions congelées de plusieurs lots ou séries de lots sont regroupés pour obtenir une quantité d'ADN suffisante pour être dosée par la technique de BURTON. En effet, les tissus contiennent moins d'ADN que de protéines et le volume de broyat nécessaire au dosage d'ADN est beaucoup plus grand que pour les protéines. Pour éviter cet inconvénient nous avons adapté la technique de BURTON aux petites quantités : jusqu'à 1 microgramme dans 100 microlitres.

La précipitation à froid (30 à 60 minutes dans la glace, en PCA à 5%), omise pour le dosage de l'ADN des embryons entiers où le matériel est surabondant, est nécessaire ici, moins pour éliminer les petites molécules que pour élever la concentration en ADN. Le précipité contient les grosses molécules, donc l'ADN, qui est alors hydrolysé à chaud (20 à 25 minutes à 70°) dans un très petit volume de PCA à 5%. L'hydrolysat, après élimination du précipité par centrifugation, est utilisé pour le dosage de l'ADN.

D - Culture des gonades.

Nous avons employé la technique de culture de WOLFF et HAFFEN (1952) pour réaliser "in vitro" l'incorporation de précurseur radioactif.

Le milieu semi-solide est coulé à chaud dans des godets en verre appelés salières, fermés par un couvercle en verre. Chaque salière contient environ 1 ml de milieu composé de deux parties de gélose à 1% dans du liquide de Gey, 1 partie d'extrait d'embryon de Poulet de 9 jours et 1 partie de Tyrode. Ce milieu est le milieu standard.

En plus de la thymidine tritiée (^{3}HTdr), nécessaire pour les expériences de marquage de l'ADN, le milieu standard a été complété par l'addition de thymidine froide, c'est-à-dire non radioactive. En effet, DENDY (1968) et BEAUPAIN (1972) ont montré que le précurseur radioactif de l'ADN n'est pas incorporé de façon homogène dans le tissu en culture sur le milieu standard. Seule la partie en contact avec le milieu semble accessible au précurseur et se marque. Nous avons pu faire la même observation sur les coupes de gonades traitées en autoradiographie (voir photos de la Fig. n°1). La mesure de la radioactivité contenue dans l'organe entier n'a donc aucun sens dans ces conditions. Cependant, nous avons montré avec LIEBART (1972) qu'il suffit d'ajouter de la thymidine froide au milieu de culture pour assurer une concentration homogène du précurseur dans l'organe, contrôlée par la répartition du marquage (Fig. n°1).

Nous avons mesuré (GASC et LIEBART, 1972) que, dans nos conditions expérimentales, l'extrait d'embryon apporte 1 à 10.10^{-6} mM de thymidine par ml de milieu, et la ^{3}HTdr (10 microCi/ml de milieu ; activité spécifique : 15 Ci/mM) apporte $0,7.10^{-6}$ mM/ml de milieu. On doit alors ajouter 50.10^{-6} mM de thymidine froide par ml de milieu pour avoir une incorporation homogène de ^{3}HTdr dans tout l'organe. Le précurseur radioactif et la thymidine froide sont ajoutés au Tyrode avant la préparation du milieu.

Après le prélèvement les gonades sont déposées sur un milieu standard puis transportées par lots de 7 ou de 5 sur le milieu définitif contenant la thymidine froide et ^{3}HTdr . Au moment de ce transfert, chaque gonade reçoit une goutte de Tyrode

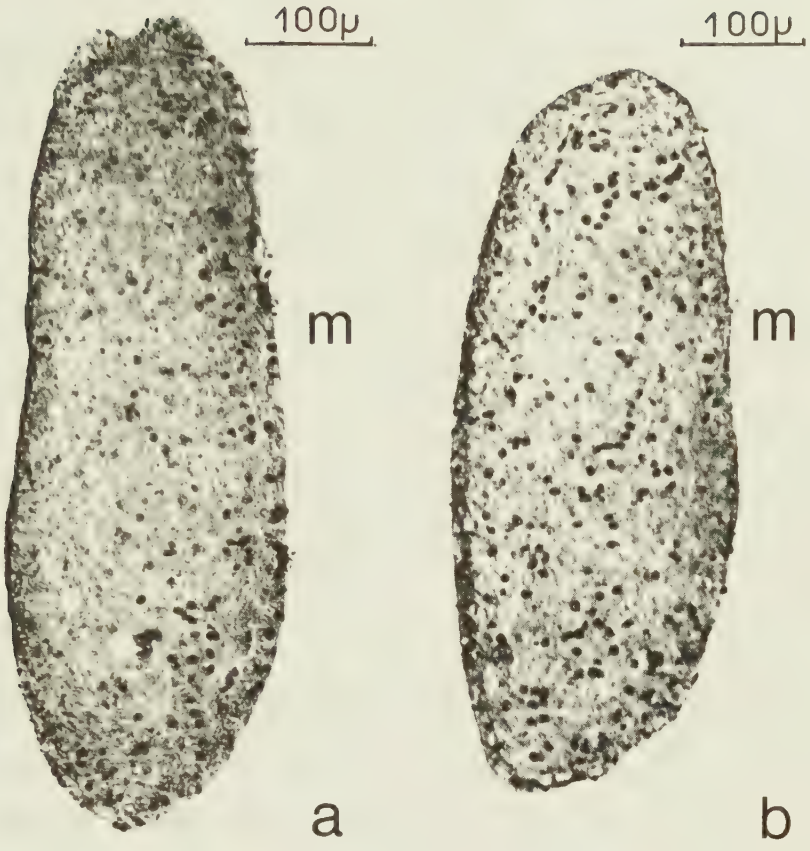


Fig. n°1 : Coupes d'ovaires gauches d'embryon de Poulet de 8 jours, préparées par autoradiographie après 4 heures de marquage à la ^{3}HTdr. La face de la gonade en contact avec le milieu pendant la culture est indiquée par m.

a : ovaire cultivé sur milieu normal ;

b : ovaire cultivé sur milieu enrichi en thymidine froide.

qui contient de la thymidine aux mêmes concentrations que le milieu, afin d'éviter l'assèchement des organes et de faciliter les échanges avec le milieu. Les salières sont ensuite refermées et placées à

à 37,3 ± 0,2°C pendant 4 heures.

A la fin de la culture, les gonades du même sexe sont regroupées par lots de 7 ou de 5 en séparant les gauches et les droites. Les organes homologues ainsi réunis sont lavés et broyés dans du Tyrode. Le broyage est réalisé dans un petit homogénéiseur en verre rôdé. Une partie du broyat est prélevé sur les dosages de protéines et d'ADN (voir les détails au paragraphe C), l'autre partie est précipitée au PCA (concentration finale 5%) à froid pour éliminer la ^{3}HTdr non incorporée dans les grosses molécules. Le précipité est filtré sur filtre en fibre de verre (WHATMAN GFB) puis lavé et séché. Le filtre sec est plongé dans une fiole contenant un liquide scintillant à base de toluène, et la radioactivité du précipité est mesurée dans un compteur Mark I de Nuclear Chicago. La moyenne de 2 ou 3 comptages successifs est faite pour obtenir la valeur de chaque échantillon déposé sur un filtre. Les valeurs ainsi calculées s'expriment en coups par minute ou Cpm, et peuvent être rapportées soit à une gonade, soit à la quantité de protéines ou d'ADN contenue dans la gonade. Chaque Cpm représente une quantité déterminée de thymidine incorporée dans l'ADN. On pourrait donc exprimer les résultats de ces mesures en nombre de molécules de thymidine incorporée dans l'ADN. Cependant nous ne le ferons pas pour éviter une confusion entre les résultats et leur interprétation. Cette réserve, justifiée par les critiques faites à la technique de marquage à la thymidine tritiée, ne change pas la validité des résultats obtenus. Ceux-ci seront exposés comme ils ont été mesurés, en Cpm, puis leur signification en termes de synthèse d'ADN et de croissance sera discutée.

La technique habituelle d'autoradiographie a été utilisée (CARO et Van TUBERGEN, 1962) pour contrôler l'homogénéité de la répar-

tition du marquage sur les coupes de gonades dans les conditions décrites ci-dessus. Pour que le marquage soit bien visible sur les coupes la concentration en ^{3}HTdr doit être multipliée par 10. L'incidence de cette augmentation sur la concentration totale en thymidine est négligeable car l'apport principal est celui de la thymidine froide.

E - Marquage des gonades dans l'oeuf.

La technique décrite au paragraphe précédent est réalisable à partir de 6 jours chez le Poulet et de 7 jours chez le Canard. Avant ces stades les gonades sont trop fragiles pour être prélevées sans dommage ou sans contamination par du mésonéphros. Le marquage de l'ADN des gonades directement dans l'oeuf apporte une solution à cette difficulté.

Chaque oeuf de Poule ou de Cane reçoit 40 à 60 microCi de ^{3}HTdr (activité spécifique 25 Ci/mM) dans 50 microlitres de Tyrode. Le liquide est déposé sur l'allantoïde, puis les oeufs sont refermés et remis en incubation pendant 4 heures à 38,0 $\pm$ 0,3°C. Dans un cas l'incorporation est interrompue après une heure, et malgré cela le marquage est homogène sur toute la surface des coupes.

Après 4 heures, la région gonadique de chaque embryon est prélevée, lavée, marquée à sa partie caudale (face ventrale) avec du noir animal et fixée dans du Carnoy pendant une heure à 4°C. La région gonadique comprend en plus des gonades, le mésonéphros sous-jacent, le mésentère qui soutenait l'intestin, et, pour les embryons les plus jeunes, toute la portion du tronc située dorsalement par

rapport au mésonéphros. Les pièces fixées sont ensuite conservées au froid pendant 16 à 20 heures dans l'alcool à 70°.

Elles sont ensuite déshydratées et incluses dans la paraffine. Le noir animal permet d'orienter les pièces et de distinguer la gonade gauche de la droite. Les coupes sont faites à 5 microns. Les rubans de coupes sont placées sur lame de verre, mais le premier et le dernier ruban de chaque lame est un ruban de coupes non marquées. Cette disposition permet d'éviter les anomalies de marquage sur le pourtour des lames, anomalies propres à la technique de trempage dans l'émulsion.

Coloration de Feulgen - Trempage des lames dans l'émulsion

Les coupes ainsi montées sont déparaffinées, réhydratées, collodionées et passées dans l'alcool-formol selon la technique habituelle de la coloration de Feulgen. Les coupes sont hydrolysées dans un bain d'HCl 1N à 60°C pendant 8 minutes puis colorées dans le réactif de Schiff pendant 70 minutes à 4°C à l'obscurité, et enfin trempées dans 2 bains d'eau sulfureuse (5 minutes). Après rinçage de 10 à 20 minutes à l'eau courante les lames sont prêtes à tremper dans l'émulsion K5 de Ilford préparée par dilution au 1/3 dans l'eau distillée et maintenue à 40°C. L'hydrolyse au PCA habituellement pratiquée sur les coupes avant trempage est inutile après celle effectuée pour la coloration. Les lames sont maintenues à l'obscurité pendant 2 semaines puis révélées avec du Microdol X de Kodak, et fixées. Enfin, après déshydratation, les coupes sont montées dans le baume, sans autre coloration. Lorsque cela est possible toutes les lames d'un même embryon sont traitées ensemble à toutes les étapes afin de limiter les variations de marquage dues aux conditions expérimentales.

Les lames ainsi préparées servent pour localiser le marquage et pour mesurer son intensité. La technique de mesure est décrite dans le paragraphe suivant.

F - Mesure de la radioactivité sur coupes.

La mesure de l'intensité du marquage des coupes est faite avec un microphotomètre de Leitz, modèle MPV, équipé d'un objectif à immersion(x105).Le champ de mesure est limité par un diaphragme circulaire et couvre la surface de 5 à 10 cellules. Le diamètre de ce champ est le même pour toutes les mesures d'une même série correspondant aux 2 gonades d'un embryon, mais il varie un peu d'une série à l'autre. Ces variations n'ont pas d'incidence sur les mesures car celles-ci sont faites par rapport à une valeur fixée arbitrairement à 100. Les mesures sont faites sur les coupes des gonades gauche et droite alternativement pour limiter les erreurs et les variations incontrolables des conditions de mesures.

Une coupe sur 5 seulement est mesurée pour les gonades de Poulet de 4,5 et 5 jours et de Canard de 6 jours, et une sur 10 pour le Poulet de 6 jours et le Canard de 7 jours. Sur chaque coupe de gonade nous effectuons plusieurs mesures réparties uniformément sur toute la surface à mesurer. Cette surface peut être soit la coupe entière, soit une zone limitée de celle-ci : la zone externe bordant le coelome et correspondant au cortex, ou la zone interne proche du mésonéphros correspondant à la médulla. Cette 2ème zone est en fait plus restreinte que la médulla car nous avons choisi de mesurer les plages seulement dans la partie la plus profonde par rapport au cortex, c'est-à-dire celle qui est dépourvue de cordons sexuels primaires. Au contraire, lorsque la surface à mesurer recouvre toute la coupe sans distinction de zone, la région des cordons, que nous appelons zone sous-corticale, est mesurée au même titre que le reste de

la coupe. Nous avons donc fait 2 séries de mesures : l'une porte sur tous les tissus de la gonade indistinctement, l'autre porte séparément sur le cortex et sur une partie de la médulla.

Le principe des mesures est le suivant : les grains d'argent visibles sur les coupes sont excités par un rayonnement U.V. et renvoient une fluorescence verte dont l'intensité est mesurée par un photomètre. Cette fluorescence est proportionnelle à la quantité de radioactivité qui a produit les grains d'argent après révélation et fixation de l'émulsion photographique.

L'intensité moyenne du marquage varie considérablement d'un embryon à un autre malgré la rigueur des conditions expérimentales. Les techniques histologiques ou autoradiographiques ne sont pas en cause puisque toutes les coupes d'un même embryon montrent un marquage uniforme tandis que de grandes différences sont observées entre deux embryons inclus dans le même bloc de paraffine, et dont les coupes sont voisines de 1 mm pendant toutes les étapes de la préparation. On doit plutôt rechercher les causes de ces différences dans une mauvaise distribution de ^{3}HTdr dans l'oeuf pendant la période d'incorporation : dilution plus ou moins importante du précurseur dans le sang ou le liquide allantoidien par exemple. Cette inégalité du marquage a deux conséquences : d'une part l'élimination de certains embryons trop peu marqués et d'autre part l'impossibilité de comparer les valeurs absolues des mesures d'un embryon à l'autre.

La mesure de l'intensité du marquage se fait en référence à une valeur 100 donnée arbitrairement à la mesure d'une plage où tous les noyaux sont fortement marqués. Cette référence est la même pour toutes les coupes d'un même embryon mais varie pour chaque embryon avec son marquage moyen. On peut donc comparer entre elles les valeurs absolues des mesures d'un même embryon mais pas celles de

deux embryons différents. Dans ce cas, on peut seulement comparer les rapports entre gauche et droite, mâle et femelle, cortex et médulla.

Avant toute utilisation pour les calculs ou l'interprétation des résultats, les valeurs moyennes sont corrigées de la valeur du "bruit de fond" propre à chaque série de lames. Ce "bruit de fond" est une fluorescence qui ne correspond pas à la radioactivité incorporée dans les noyaux. Cette fluorescence est produite par la coloration de Feulgen et par des grains d'argent répartis uniformément sur toute la surface des coupes. La somme de ces deux sources parasites de fluorescence est mesurée sur des plages ne présentant pas de radioactivité de marquage spécifiquement nucléaire. La valeur moyenne du "bruit de fond" total (marquage parasite et coloration) est déduite de la valeur moyenne des mesures de chaque gonade.

C - Calculs statistiques.

Dans le cas de différences numériques faibles entre deux moyennes ou d'une grande dispersion des mesures autour de la moyenne nous avons eu recours aux méthodes statistiques pour établir la signification de ces différences. Pour la conduite des calculs et leur interprétation nous avons suivi les indications de M. LAMOTTE (1957). Nous avons seulement utilisé le test d'homogénéité de deux ou plusieurs échantillons et le coefficient de corrélation de deux séries de mesures.

Pour le test d'homogénéité de deux échantillons nous avons comparé la valeur du coefficient t de Student à celles données dans

les tableaux. De même pour un ensemble d'échantillons la comparaison de leur variance par les tables de SNEDECOR permet d'estimer la probabilité d'une origine commune de ces échantillons.

Le coefficient de corrélation mesure le degré d'interdépendance des fluctuations de deux grandeurs. Dans notre cas les deux grandeurs sont les quantités de protéines contenues dans les gonades gauche et droite d'un même embryon. Le coefficient est calculé pour un ensemble d'embryons du même âge. S'il est proche de +1 la corrélation entre les deux ensembles de mesures est nettement positive, et les fluctuations des quantités de protéines dans les deux gonades sont donc liées. S'il est proche de 0 les fluctuations sont aléatoires et les quantités de protéines à gauche et à droite sont indépendantes.

H - Identification précoce du sexe génotypique des embryons.

Après la différenciation sexuelle, un examen anatomique de la région gonadique suffit pour distinguer les embryons mâles des femelles. Ce moyen est utilisable à partir de 8 jours pour le poulet et un jour plus tard pour le Canard. Des différences morphologiques discrètes apparaissent dans la journée précédente mais elle ne permettent pas une identification sûre du sexe de l'embryon. Aux stades jeunes, le sexe phénotypique n'étant pas utilisable, nous avons cherché à déterminer le sexe génotypique.

La fréquence de la chromatine sexuelle dans les noyaux en interphase est un caractère génétique lié au sexe (ISHIZAKI et KOSIN, 1960). Cette technique est assez longue à réaliser et son emploi pour les oiseaux a souvent été critiqué (HAMMAR, 1964 ; GEE, 1971 ; BHATNAGAR, 1972 ; GORRECKI et DOMM, 1972). Nous lui avons préféré la

préparation des caryogrammes, sur lesquels les hétérochromosomes, signe du sexe génétique, sont identifiables.

Nous avons utilisé la technique décrite par OMURA (1970) pour le Poulet, que nous avons modifiée puis adaptée au Canard et à la Caille (GASC, 1973).

Les hématies des oiseaux sont nucléées, et pendant une période de quelques jours de la vie embryonnaire elles prolifèrent beaucoup dans le sang circulant où l'on trouve de nombreuses mitoses qui peuvent servir pour la préparation des caryogrammes. Par rapport aux autres techniques utilisant les caryogrammes pour l'identification du sexe génotypique (SHOFFNER et coll., 1967) celle que nous avons pratiquée à l'avantage d'être rapide, sûre et de ne pas léser l'embryon qui peut donc continuer son développement normal. Par ce moyen on peut donc connaître avec certitude le sexe des embryons avant leur utilisation dans les expériences.

a) Description de la technique.

Les oeufs de Poulet, de Canard ou de Caille sont incubés debout, chambre à air vers le haut. A 4 jours chez le Poulet et la Caille, 5 jours chez le Canard, la coquille est ouverte au niveau de la chambre à air. A l'aide d'une fine aiguille on blesse un petit vaisseau de la circulation extra-embryonnaire. Une hémorragie locale se produit et on prélève un peu de sang (1 à 10 microlitres) avec un fin capillaire de verre. Les oeufs sont refermés avec un ruban adhésif et remis en incubation. Le sang est étalé sur une lame de verre dans 100 à 150 microlitres de citrate de Na à 0,9% (Poulet) ou 1,2% (Canard et Caille). Les frottis sanguins de Poulet sont laissés 10 minutes à l'air, ceux de Caille et de Canard sont laissés pendant 15

minutes en atmosphère humide. Ensuite, les lames sont transportées horizontalement dans une chambre humide en vapeurs d'alcool-acétique (mélange liquide composé de : 1 volume d'éthanol, 3 volumes d'acide acétique glacial et 4 volumes d'eau). Cette préfixation dure 45 minutes pour la Caille et 60 minutes pour le Poulet et le Canard. Ensuite les lames sont égouttées en les inclinant à 45° pendant 1 minute, et fixées 2 secondes dans l'alcool absolu et 2 minutes (Poulet), 3 minutes (Canard) ou 4 minutes (Caille) dans l'alcool-acétique (4 vol. d'alcool 100° et 5 vol. d'acide acétique). Les lames sont séchées à l'air avant d'être colorées au Giemsa. La coloration est faite directement sur chaque lame en mélangeant 9 gouttes de colorant et 14 gouttes de tampon phosphate à pH 7,4.

b) Description du caryotype.

Des exemples de caryogrammes préparés par cette technique sont donnés sur les photos de la Fig. n°2. Les 6 plus grandes paires de chromosomes ont été dessinées sur la planche de figure n°3. On y remarque particulièrement que la paire d'hétérochromosomes est la 4ème par ordre décroissant de longueur. Un seul élément de cette paire est présent chez la femelle. Le 2ème est remplacé par un petit chromosome, appelé W, de longueur égale à la 7ème paire chez le Poulet, à la 7ème ou 8ème paire chez le Canard, et à la 6ème paire chez la Caille.

On remarque aussi la grande ressemblance de ces 6 premières paires chez le Poulet et la Caille. Des descriptions comparées des caryotypes ont été faites pour établir la parenté phylogénétique entre ces espèces (voir bibliographie dans GASC, 1975).

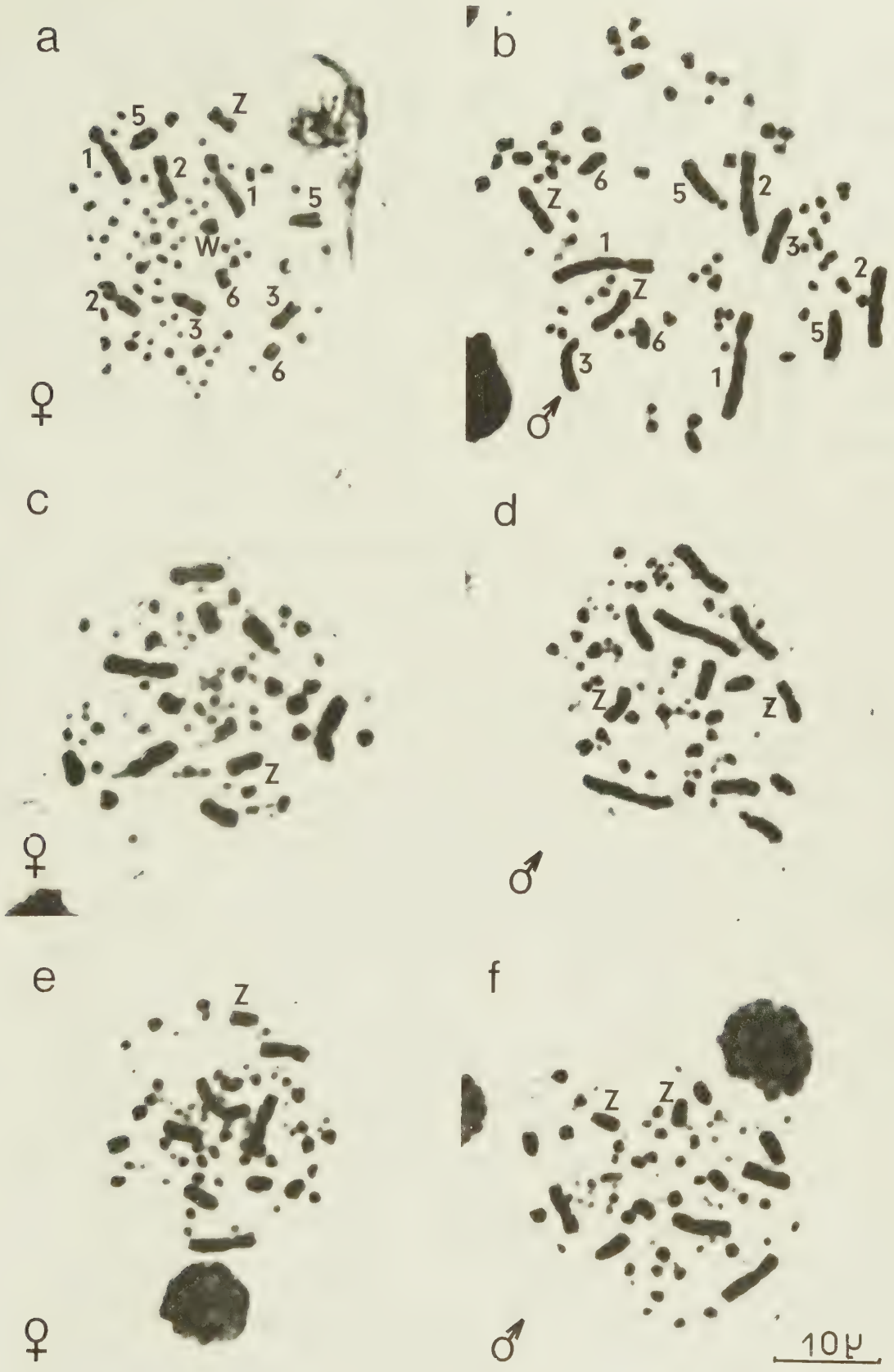


Figure n° 2 : Frottis sanguins colorés au Giemsa. Caille (a et b) ; Poulet (c et d) ; Canard (e et f).

Fig. n°3 : Les 6 premières paires de chromosomes classées par ordre décroissant de longueur.

En plus de ces 6 grandes paires, les photos de mitose montrent de nombreux petits chromosomes : une soixantaine au moins. Le nombre exact n'est pas connu, bien que l'on admette maintenant son invariabilité. En effet ces petits éléments, appelés aussi microchromosomes, ont d'abord été considérés comme de vrais chromosomes dans les premières descriptions exactes des caryotypes (MILLER, 1938 ; OGUMA, 1938 ; YAMASHINA, 1944). Mais ensuite leur nature réellement chromosomique a été mise en doute par certains auteurs qui les considéraient comme des fragments de grands chromosomes, comme des particules de nature incertaine, voire comme des artéfacts (BRANT, 1952 ; Van BRINK et UBBELS, 1956 ; NEWCOMER, 1957) . Maintenant, leur nature et leur invariabilité ne sont plus mises en doute, et leur rôle dans la transmission et l'expression du patrimoine héréditaire est étudié (COMINGS et MATOCCIA, 1972). Le nombre diploide total le plus souvent proposé est de 78 pour la Caille (OGUMA, 1938 ; VEGNI-TALLURI et

VEGNI, 1965), et le Poulet (OGUMA, 1938 ; MILLER, 1938 ; YAMASHINA, 1944 ; VAN BRINK, 1959) et 80 pour le Canard (OGUMA, 1938 ; OHNO et coll. , 1964 ; CUCCHI, 1969).

Les chromosomes que nous appelons Z ont été décrits comme hétérochromosomes pour la première fois de façon sûre par MILLER (1938) pour le Poulet et par OGUMA (1938) pour la Caille et le Canard, après des observations de UNGER (1936), de SUZUKI (1930) et de SOKOLOV et coll. (1934 et 1936) dont les travaux sont cités et discutés par OGUMA. Ensuite ces descriptions ont été confirmées par VEGNI-TALLURI et VEGNI (1965) (Caille), par FREDERIC (1961) (Poulet) et par KRISHAN (1963) (Canard). Quelques différences subsistent cependant entre les descriptions de certains auteurs. Ainsi le chromosome Z est souvent placé en 5ème position par ordre de longueur (OGUMA, 1938 ; FREDERIC, 1961 ; KRISHAN, 1963 ; HARTUNG et STAHL, 1974), mais des mesures précises (VEGNI-TALLURI et VEGNI, 1965 ; BEROS, 1971) montrent qu'il est bien le 4ème. La 5ème paire chez la Caille et la 3ème paire chez le Canard sont télocentriques ou subtélocentriques selon les auteurs car les préparations ne sont pas toujours assez nettes pour préciser la position du centromère. Les techniques de préparation peuvent aussi modifier l'aspect des chromosomes, ainsi,HARTUNG et STAHL (1974) ont montré que le W de la Caille devenait subtélocentrique après traitement enzymatique. Un bras très court est donc décelé par cette préparation.

Le chromosome W a été identifié pour la première fois chez les oiseaux par FREDERIC (1961) sur le Poulet. La formule chromosomique ZW pouvait donc enfin être attribuée avec certitude à la femelle des oiseaux. Ensuite le chromosome W a été décrit chez la Caille

par VEGNI-TALLURI et VEGNI (1965) et chez le Canard (MOTT et coll., 1968). Dans cette dernière espèce nous l'identifions comme un élément de longueur égale aux 7ème et au 8ème paires.

Les caryotypes des trois espèces d'oiseaux citées sont donc maintenant bien connus et les descriptions ne diffèrent entre elles que par quelques détails.

c) Utilisation des caryogrammes pour l'identification du sexe.

Les caryogrammes peuvent être préparés à partir de 3,5 jours chez le Poulet et la Caille, et 4,5 chez le Canard. En une journée le sexe génotypique est identifié et les embryons sont disponibles pour les expériences. L'identification du sexe se fait par appariement des 6 plus longues paires de chromosomes. Les cellules contenant les 6 paires complètes proviennent d'un embryon mâle car elles ont 2 chromosomes Z. Celles contenant seulement 5 paires et un élément non appariable (médiocentrique chez le Poulet et la Caille, ou télocentrique chez le Canard) proviennent d'un embryon femelle puisqu'elles ont un seul chromosome Z. Le W n'est pas toujours reconnaissable en raison de sa petite dimension.

La sûreté de cette technique a été contrôlée par le sexe phénotypique des embryons après la différenciation sexuelle, entre 8 et 10 jours. Avec les préparations de Poulet nous n'avons jamais constaté d'erreur. Avec le Canard et la Caille les résultats sont un peu moins bons. Si plus de la moitié des préparations sont de qualité égale à celle de Poulet, le reste est soit inutilisable

faute de mitoses, soit à utiliser avec précaution car les mitoses y sont rares et peu nettes. Avec ces préparations de qualité médiocre nous avons constaté quelques erreurs d'identification du sexe génotypique (GASC, 1973). Il est donc préférable de les éliminer lorsque les conditions de l'expérience le permettent. On peut donc ainsi éviter les erreurs probables et la sûreté de cette technique est totale.

P R E M I E R E P A R T I E

CROISSANCE CORPORELLE DES EMBRYONS DE POULET ET DE CANARD

La mesure la plus simple de la croissance de l'embryon de Poulet est celle de l'augmentation du poids, qui est la résultante de tous les phénomènes réalisant le développement embryonnaire. Plusieurs auteurs ont mesuré cet accroissement soit pour décrire quantitativement la croissance embryonnaire (DAVIS et GARRISON, 1968), soit pour comparer la croissance d'un organe à celle du corps entier (VENZKE, 1943), soit pour connaître l'effet d'un traitement sur l'embryon (SCHMALHAUSEN, 1926 ; ROMANOFF et coll., 1938 ; CASE, 1952 ; ATHERTON et TIMIRAS, 1970 ; HALL, 1970 ; ADJOVI et IDELMAN, 1973 ; GIROUARD et HALL, 1973). La forme générale et les particularités de la courbe de croissance pondérale sont à l'origine de considérations théoriques sur la croissance embryonnaire et conduisent certains auteurs à placer des étapes ou des crises dans le cours du développement (DAVIS et GARRISON, 1968 ; ADJOVI et IDELMAN, 1973).

Un seul travail est cité dans la littérature sur la croissance pondérale de l'embryon de Canard (ROMANOFF, 1960).

Les courbes de croissance tracées à partir des mesures de ces différents auteurs sont assez proches les unes des autres par leur forme malgré des écarts sensibles entre les valeurs mesu-

rées. Ces différences peuvent s'expliquer par la variabilité des souches de Poulet utilisées, par les conditions de mesure et par le décalage de stade d'un travail à l'autre.

En coordonnées normales la courbe est de forme exponentielle. En coordonnées semi-logarithmiques elle est presque rectiligne et sa pente diminue lentement mais constamment au cours du développement. Cela représente une croissance de type exponentiel à taux variable, tout à fait semblable à celle décrite pour les embryons de petits mammifères (LINDH, 1961 ; GOEDBLOED, 1972 ; JEAN, 1973).

NOVIKOFF et POTTER (1948) ont obtenu une courbe assez semblable à celle de la croissance pondérale en mesurant la quantité d'ADN contenue dans le corps entier de l'embryon de Poulet de 1 à 20 jours. Pendant la première moitié de l'incubation la croissance en ADN est de type exponentiel avec un ralentissement progressif du taux d'accroissement. Mais, cette courbe est assez imprécise car elle est tracée à partir de peu de points. Nous avons donc repris ces mesures afin de les préciser sur une période limitée et nous les avons complétées par la mesure des quantités de protéines. Ces deux constituants majeurs de la matière vivante, l'ADN et les protéines, reflètent plus directement que le poids l'activité de croissance de l'embryon : la prolifération cellulaire et la synthèse protéique. Leur mesure simultanée (voir matériel et techniques) est un facteur important de cohérence entre ces deux séries de résultats dont l'interprétation est alors simplifiée et la signification renforcée.

I -- CROISSANCE DES EMBRYONS DE POULET

Résultats

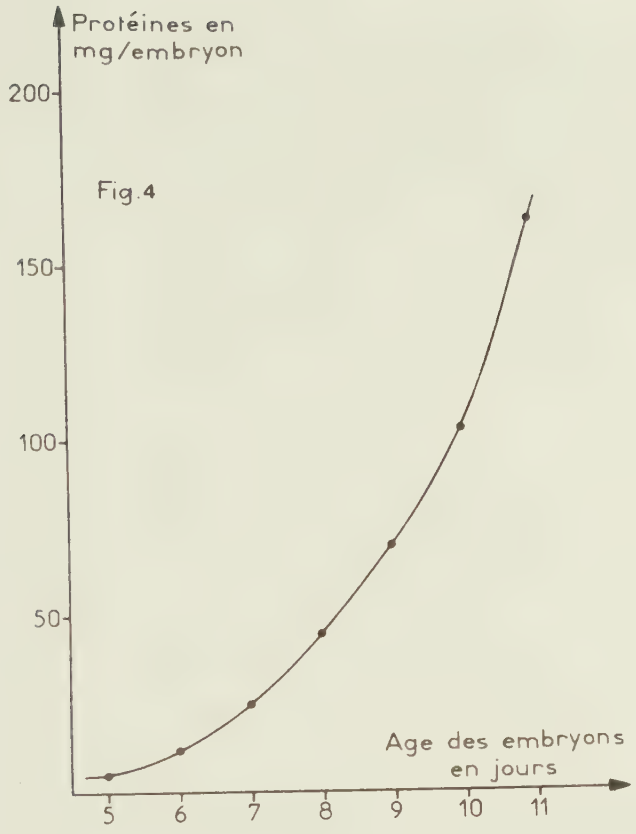
Pour le Poulet nous avons mesuré la croissance corporelle des embryons entre 5 et 11 jours, séparément pour les mâles et les femelles.

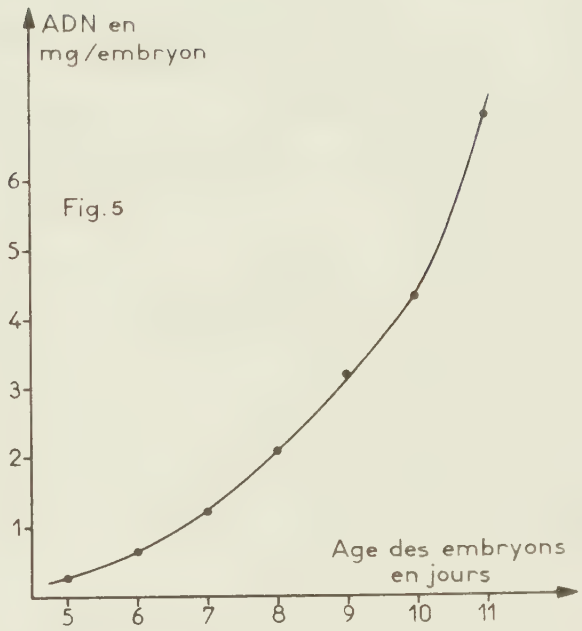
L'estimation des quantités de protéines contenues dans les embryons est donnée dans le tableau n°1. A tous les âges les embryons mâles contiennent plus de protéines que les femelles. Cet écart est faible (Tableau n°4) mais aucune erreur systématique ne peut l'expliquer car les mesures sont faites de façon anonyme, le sexe n'étant pas connu.

Age en jours	Nombre		A D N		Protéines		Protéines / ADN	
	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂
5	33	33	0,268	0,290	4,43	4,69	16,5	16,2
6	84	87	0,641	0,671	11,7	12,6	18,3	18,8
7	70	65	1,21	1,25	25,1	25,7	20,8	20,6
8	70	75	2,07	2,10	44,7	45,7	21,6	21,8
9	60	50	3,13	3,28	68,8	72,4	22,0	22,1
10	60	60	4,29	4,32	103	104	24,0	24,1
11	45	45	6,78	7,11	159	169	23,4	23,8

Tableau n°1 : Embryons de Poulet de 5 à 11 jours. Protéines et ADN en milligrammes par embryon. Le rapport $\frac{\text{protéines}}{\text{ADN}}$ est calculé par le rapport des moyennes.

Nombre : Nombre d'embryons utilisés pour les mesures.





Embryon de Poulet. Croissance corporelle en protéines (Fig. n°4) et en ADN (Fig. n°5). Coordonnées normales.

Sur les courbes (Fig. n°4 et 6), tracées à partir des valeurs du tableau n°1, les mâles et les femelles ont été confondus en une seule moyenne. La courbe en coordonnées normales (Fig. n°4) est de type exponentiel, mais le tracé en coordonnées semi-logarithmiques (Fig. n°6) montre que le taux d'accroissement quotidien diminue au cours du développement puisque la pente des segments de droite décroît. Le tableau n°2 donne les valeurs de ce taux calculées par l'accroissement de la quantité de protéines entre les

jours n et n+1, rapportée à la quantité contenue au jour n+2/3 (LAIRD, 1965). C'est en effet à n+2/3 que, dans une croissance de type exponentiel, la moitié de l'accroissement de n à n+1 est réalisée. Les quantités de protéines à n+2/3 et la différence (n+1)-n sont estimées sur les courbes. Dans ces conditions, le taux d'accroissement quotidien varie de 0,87 à 0,60 puis à 0,40 en 2 étapes.

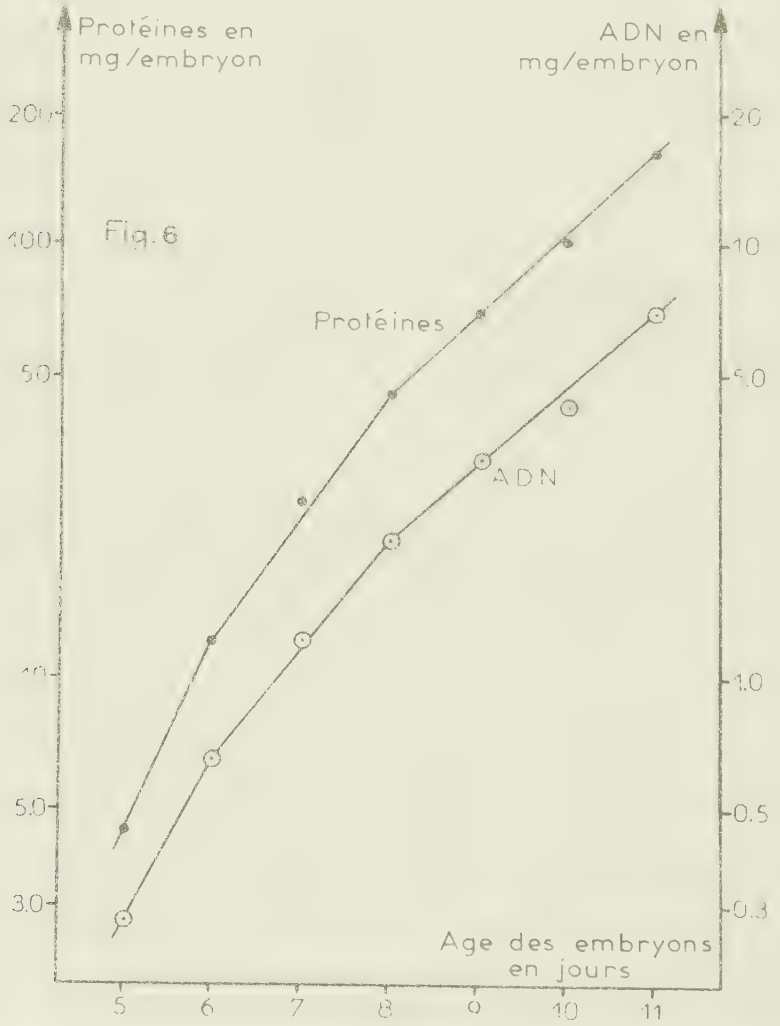


Fig. n°6 : Embryon de Poulet. Croissance corporelle en ADN et en protéines. Coordonnées semi-logarithmiques.

Période	POULET Taux d'accroissement quotidien		CANARD Taux d'accroissement quotidien		Période
	de l'ADN	des protéines	de l'ADN	des protéines	
5 à 6j.	0,74	0,87	0,91	0,97	6 à 7j.
6 à 7j.	0,55	0,61	0,43	0,50	7 à 8j.
7 à 8j.	0,51	0,59	0,42	0,49	8 à 9j.
8 à 9j.	0,38	0,39	0,40	0,46	9 à 10j.
9 à 10j.	0,38	0,39	0,28	0,33	10 à 11j.
10 à 11j.	0,38	0,41	—	—	——

Tableau n°2 : Taux d'accroissements quotidiens des quantités de protéines et d'ADN contenues dans le corps entier des embryons de Poulet et de Canard. Les taux sont calculés à partir des valeurs estimées sur les courbes de croissance (fig. n°4 à 9).

Les quantités d'ADN contenues dans les embryons de Poulet sont données dans le tableau n°1 et la croissance en ADN est représentée graphiquement sur les courbes des Fig. n°5 et 6.

A tous les stades étudiés les embryons mâles contiennent plus d'ADN que les femelles. Cet écart est proche de celui que nous avons déjà trouvé pour les protéines. Les courbes de croissance en

ADN ont les mêmes particularités que pour les protéines : croissance de type exponentiel avec ralentissement du taux d'accroissement. Le tableau n°2 montre que ce taux varie de 0,74 à un peu plus de 0,50 puis à 0,38 pendant l'intervalle 5-11 jours. On remarque que, si à la fin de cette période les taux quotidiens d'accroissement en protéines et en ADN sont sensiblement égaux (respectivement 0,40 et 0,38), il n'en est pas de même pendant les 6ème, 7ème et 8ème jours. A ces stades, le taux de croissance des protéines est supérieur à celui de l'ADN. Il en résulte un enrichissement relatif des embryons en protéines, mesuré par l'augmentation de 16 à 24 de la valeur du rapport $\frac{\text{quantité de protéines}}{\text{quantité d'ADN}}$ pendant cette période. A quantité égale d'ADN par cellule, il y a donc plus de protéines à 11 jours qu'à 5 jours. Il y a 16 fois plus de protéines que d'ADN à 5 jours et 24 fois plus à 10 et à 11 jours. Ces nombres sont des rapports d'estimations faites à partir de gammes de référence (voir matériel et techniques) et ne sont donc pas nécessairement exacts en valeurs absolues. Mais, à cause de l'homogénéité de nos conditions de mesure, les variations de ce rapport sont bien réelles et exactes.

Discussion

DAVIDSON et LESLIE (1950) mesurent un enrichissement plus rapide en Azote protéique qu'en Phosphore nucléique dans certains organes de l'embryon de Poulet entre 8 et 19 jours. Au contraire, ils notent une diminution de la teneur en protéines des cellules lors de la mise en culture des tissus embryonnaires et de la dédifférenciation cellulaire qui l'accompagne.

Bien que les mesures de NEEDHAM (1931), NOWINSKI et YUSHOK (1953) et de SOLOMON (1957) soient difficilement comparables à

celles de DAVIDSON et LESLIE (1950) et aux notres, c'est probablement aussi dans le sens d'un enrichissement en protéines des organes embryonnaires, ou des embryons, au cours de leur différenciation qu'elles doivent être interprétées.

L'augmentation du rapport $\frac{\text{protéines}}{\text{ADN}}$ que nous observons, illustre donc un phénomène déjà signalé par ces auteurs, mais qui apparaît de façon plus précise et plus nette dans nos résultats que dans les travaux antérieurs. La relation entre cet enrichissement et la différenciation cellulaire est difficile à établir. Nous pouvons seulement constater la coincidence et chercher d'autres causes qui peuvent expliquer l'augmentation du rapport $\frac{\text{protéines}}{\text{ADN}}$. Ainsi, il est possible que l'augmentation rapide du volume du sang, très riche en protéines sériques, modifie la valeur de ce rapport.

Les taux d'accroissement des quantités de protéines et d'ADN varient brusquement d'un stade à un autre. Ces sauts traduisent les ruptures de pente observées sur les courbes en coordonnées semi-logarithmiques. Le degré de précision de nos mesures et l'étendue de la période considérée ne permettent pas de savoir si ces variations brusques sont réelles ou si elles sont dues à la schématisation d'une variation continue du taux de croissance. Ces deux possibilités ont déjà été avancées par divers auteurs. GOEDBLOED (1972) a montré que l'embryon de Souris et quelques uns de ces organes se développent par périodes de croissance exponentielle stricte dont les taux d'accroissement varient brusquement. Selon cet auteur, ces ruptures de pente marqueraient des étapes dans le fonctionnement des organes, ou des crises plus générales dans la

croissance globale de l'embryon. Par contre, pour le Poulet, DAVIS et GARRISON (1968) sont plus nuancés et proposent seulement deux ruptures de pente au cours de l'incubation : l'une à 3-4 jours, l'autre à 7 jours. Malgré cela l'ensemble de la croissance apparaît de type exponentiel, avec un taux décroissant. Les autres travaux déjà cités confirment cette forme générale de la courbe de croissance.

Nos résultats limités ne s'inscrivent pas mieux dans l'un ou l'autre de ces modèles de croissance embryonnaire et le tracé des courbes, choisi pour sa simplicité, n'est pas un argument en faveur de l'un d'eux.

Nous avons vu que les embryons de sexe mâle contiennent plus de protéines et d'ADN que les femelles. Cet écart, en moyenne de 4%, n'est pas statistiquement significatif car la dispersion des valeurs autour de la moyenne de chaque sexe aux différents stades est très grande. On peut cependant s'étonner de cette distribution des moyennes, systématiquement supérieures dans un sexe pour les protéines et pour l'ADN. Chacun des 7 sous-échantillons que constitue chaque classe d'âge, reproduit la même différence de moyenne que l'échantillon complet de tous les embryons étudiés. Donc malgré les écarts faibles entre les moyennes de chaque sexe, malgré une grande dispersion autour de ces moyennes, les écarts sont systématiquement dans le même sens, mais ils ne sont pas significatifs. Nous discuterons ce résultat dans le paragraphe suivant en le comparant avec celui obtenu pour les embryons de Canard.

II -- CROISSANCE DES EMBRYONS DE CANARD

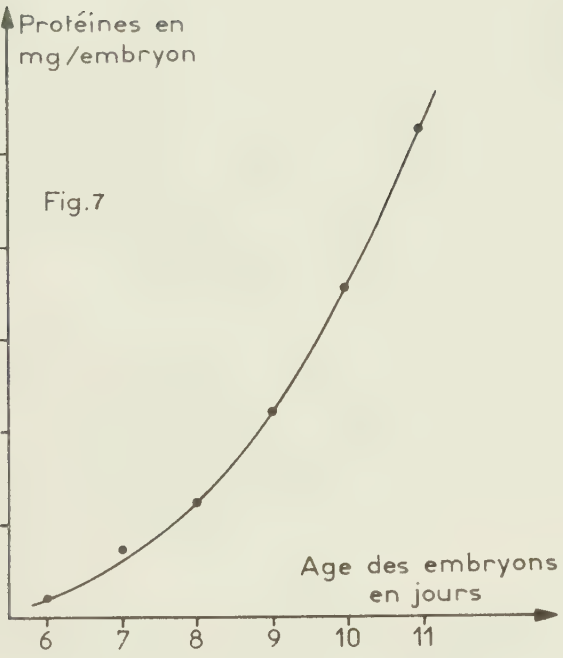
Résultats

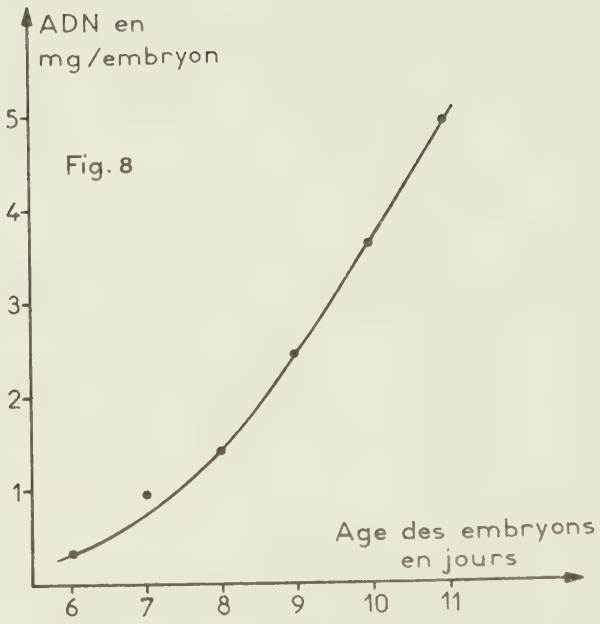
Pour le Canard, les quantités de protéines et d'ADN ont été mesurées entre 6 et 11 jours, mâles et femelles séparément. Le premier stade étudié correspond donc à celui du Poulet (5 jours), compte tenu d'un retard de 24 heures pour l'embryon de Canard. Mais la période examinée est plus courte pour le Canard puisqu'elle s'arrête à 11 jours comme pour le Poulet.

Les résultats de ces mesures sont donnés dans le tableau n°3 et représentés graphiquement sur les courbes des figures n°7 et 9.

Age en jours	Nombre		A D N		Protéines		Protéines / ADN	
	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂
6	30	31	0,352	0,330	5,12	4,73	14,6	14,3
7	75	70	0,945	0,966	15,1	15,3	16,0	15,9
8	40	35	1,43	1,43	24,4	25,0	17,1	17,5
9	85	75	2,39	2,51	43,6	45,7	18,3	18,2
10	75	65	3,57	3,69	70,0	72,8	19,6	19,8
11	63	61	4,85	5,00	99,6	102	20,6	20,4

Tableau n°3 : Embryons de Canard de 6 à 11 jours. Protéines et ADN en milligrammes par embryon. Le rapport $\frac{\text{protéines}}{\text{ADN}}$ est calculé par le rapport des moyennes. Nombre : nombre d'embryons utilisés pour les mesures.





Embryon de Canard. Croissance corporelle en protéines (Fig. n°7) et en ADN (Fig. n°8). Coordonnées normales.

Les quantités de protéines sont supérieures dans les embryons mâles, sauf à 6 jours. Cet écart est faible et varie peu d'un stade à l'autre, aussi les courbes ont été tracées à partir des valeurs moyennes, mâles et femelles confondus en un seul échantillon. Le tracé de ces courbes est de forme exponentielle et très proche de celui du Poulet. En effet, les pentes des segments de la courbe en coordonnées semi-logarithmiques sont assez voisines, et les valeurs des quantités de protéines à 8, 9, 10 et 11 jours chez

le Canard sont égales à celles du Poulet de 7, 8, 9 et 10 jours respectivement. Pendant ces périodes homologues du développement les courbes de croissance se superposent rigoureusement. Il semble seulement que le taux d'accroissement soit un peu plus élevé chez le Canard que chez le Poulet (tableau n°2). Pour le Canard ce taux varie de 0,97 pendant le 7ème jour, à environ 0,50 pendant les 8ème, 9ème et 10ème jours, puis à 0,33 pendant le 11ème jour. Ces variations brusques, dont la signification a été discutée pour le Poulet dans le paragraphe précédent, ne doivent pas être interprétées nécessairement comme des dicontinuités de croissance.

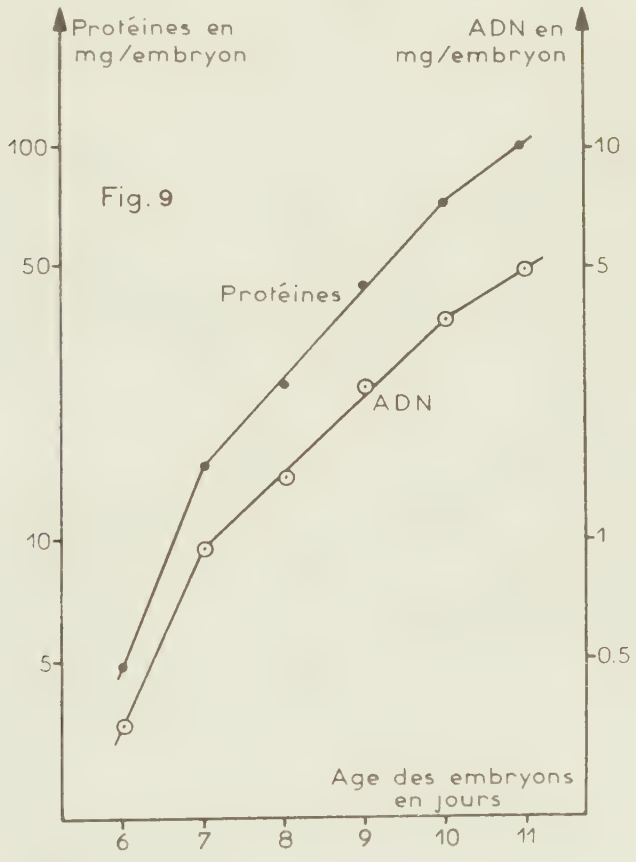


Fig. n°9 : Embryon de Canard. Croissance corporelle en ADN et en protéines. Coordonnées semi-logarithmiques.

La croissance en ADN des embryons de Canard est de type exponentiel (courbes des fig. n°8 et 9) comme celle des protéines. Le taux d'accroissement décroît de 0,91 pendant le 7ème jour à environ 0,40 pendant les 8ème, 9ème et 10ème jours, et à 0,28 pendant le 11ème jour. Ces valeurs sont constamment inférieures à celles de la croissance en protéines. Les protéines augmentent donc plus rapidement que l'ADN pendant cette période : il y a 14 fois plus de protéines que d'ADN à 6 jours, et 20,5 fois plus à 11 jours (tableau n°3). Le rapport $\frac{\text{protéines}}{\text{ADN}}$, égal dans les deux sexes, s'accroît donc progressivement comme chez le Poulet. Cet accroissement est parallèle chez le Poulet et le Canard mais les valeurs du rapport diffèrent dans les deux espèces, même compte tenu du retard de développement du Canard (courbe de la fig. n°10). La similitude d'évolution du rapport $\frac{\text{protéines}}{\text{ADN}}$ dans ces deux espèces confirme que l'enrichissement relatif en protéines au cours du développement est bien un phénomène réel. Mais les résultats obtenus avec le Canard ne précisent pas les explications déjà proposées dans le cas du Poulet.

Discussion

Les valeurs du rapport $\frac{\text{protéines}}{\text{ADN}}$ ne sont pas égales pour le Poulet et le Canard, à des stades de développement équivalents. Quel est le terme du rapport qui est à l'origine de cette différence? Nous avons vu que, à certains stades, les quantités de protéines sont égales dans les embryons des deux espèces. Il en est ainsi pour le Poulet de 7 à 10 jours et le Canard de 8 à 11 jours. Si nous supposons que cette coincidence d'un contenu protéique égal à un stade de développement homologue n'est pas fortuite mais bien liée à un même état global de différenciation, nous devons admettre

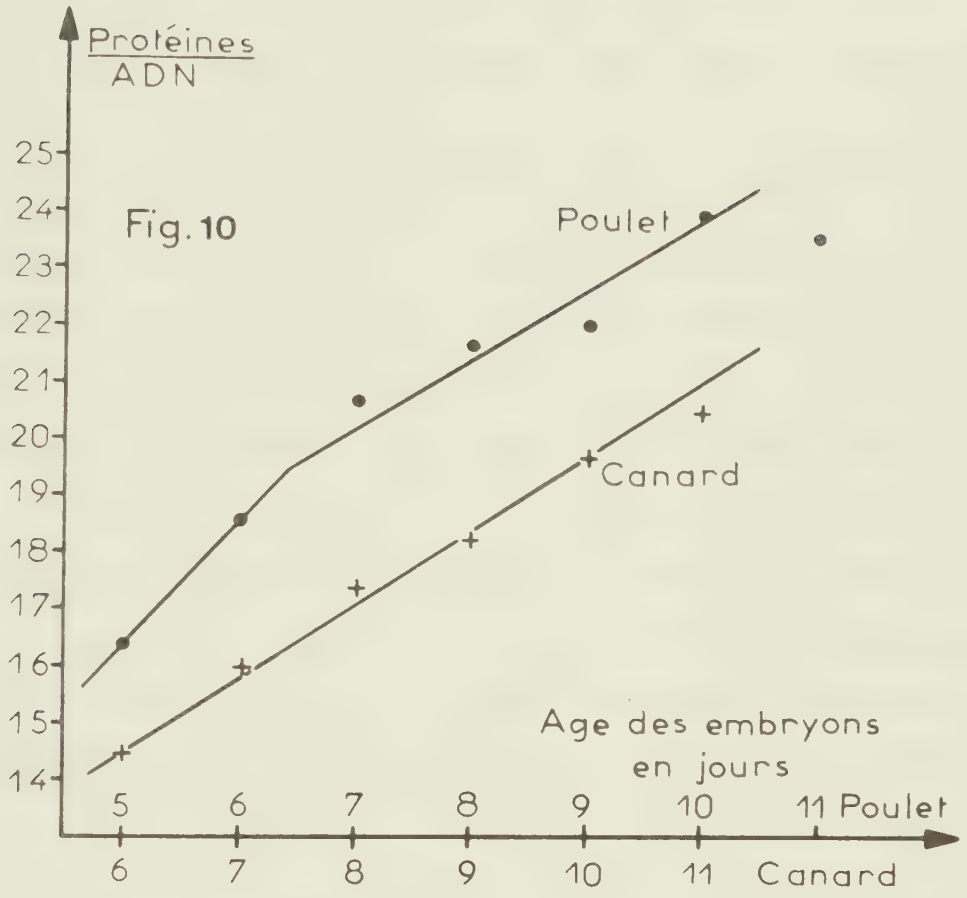


Fig. 10 : Augmentation du rapport $\frac{\text{protéines}}{\text{ADN}}$ en fonction de l'âge des embryons. L'échelle des âges du Canard est décalée de 1 jour pour superposer les stades homologues dans les deux espèces. Le rapport $\frac{\text{protéines}}{\text{ADN}}$ est calculé en mg de protéines / mg d'ADN.

que c'est l'ADN qui est responsable de l'écart entre les valeurs du rapport $\frac{\text{protéines}}{\text{ADN}}$ dans les deux espèces. Dans ce cas nous devons examiner pourquoi les embryons de Canard contiendraient plus d'ADN

que ceux de Poulet pour une même quantité de protéines. Le contenu nucléaire en ADN a souvent été mesuré chez le Poulet, soit en unités arbitraires (BACHMANN et coll., 1972), soit en quantités d'ADN (DAVIDSON et LESLIE, 1950 ; MIRSKY et RIS, 1951 ; SOLOMON, 1957 ; ATKIN et coll., 1965) mais plus rarement chez le Canard. MIRSKY et RIS (1951) ont trouvé $2{,}34.10^{-9}$ mg. d'ADN par érythrocyte de Poulet et $2{,}65.10^{-9}$ mg. pour le Canard. Ce résultat est indirectement confirmé par la mesure de la surface des chromosomes après projection dans un plan : cette surface est plus grande chez le Canard que chez le Poulet (OHNO et coll., 1964). Enfin, BACHMANN et coll. (1972) trouvent dans les cellules de Poulet la plus petite quantité d'ADN de 23 espèces d'oiseaux, à l'exception du Perroquet (Melopsittacus undulatus). Le Canard n'a pas été examiné par ces auteurs, mais leurs mesures s'accordent cependant bien avec les résultats de MIRSKY et RIS. Ainsi, l'inégalité des teneurs en ADN nucléaire, en faveur du Canard , est vraisemblable et peut expliquer les différences des valeurs du rapport $\frac{\text{protéines}}{\text{ADN}}$ entre le Poulet et le Canard aux mêmes stades de développement.

Il reste la possibilité d'une coincidence fortuite entre les contenus en protéines des embryons dans les deux espèces, et dans ce cas il n'existe aucune explication simple à la différence entre les rapports $\frac{\text{protéines}}{\text{ADN}}$ chez le Poulet et le Canard.

Le tableau n°3 montre la supériorité du contenu en protéines et en ADN des embryons mâles par rapport aux femelles entre 7 et 11 jours;sauf à 8 jours où les quantités d'ADN sont égales. Il s'agit probablement d'un cas limite que nous pouvons joindre à ceux

qui l'entourent et nous pouvons admettre la supériorité du contenu des mâles entre 7 et 11 jours (Tableau n°4).

Age en jours	POULET		CANARD		Age en jours
	A D N	Protéines	A D N	Protéines	
5	+8,2%	+5,9%	-6,3%	-7,6%	6
6	+4,7%	+7,7%	+2,2%	+1,3%	7
7	+3,3%	+2,4%	0 %	+4,1%	8
8	+1,5%	+2,2%	+5,0%	+4,8%	9
9	+4,8%	+5,2%	+3,4%	+4,0%	10
10	+0,7%	+1,0%	+3,1%	+2,4%	11
11	+4,9%	+6,3%	—	—	—

Tableau n°4 : Excès d'ADN et de protéines dans les embryons mâles par rapport aux femelles, calculés d'après les valeurs des tableaux n°1 et 3.

A 6 jours les valeurs des femelles l'emportent sur les mâles . Ces valeurs, moyennes de 30 mesures sur celles des femelles et 31 sur des mâles, ne sont statistiquement distinctes ni pour les protéines ni pour l'ADN. Il est donc impossible d'affirmer que les embryons femelles de Canard contiennent plus de protéines et d'ADN que les mâles à 6 jours.

Pour les stades suivants, où la différence est inversée, aucun des écarts mâle-femelle n'est significatif. Comme pour le

Poulet nous retrouvons là une conséquence de la faiblesse de ces écarts et de la grande dispersion des mesures autour de la moyenne de chaque stade. Cependant, il est possible d'accroître artificiellement l'échantillon de mesures du calcul statistique en considérant comme faisant partie d'un seul échantillon toutes les mesures réalisées sur des embryons d'âges différents et de même sexe. Pour cela il faut transformer la valeur absolue de chaque mesure en sa valeur relative à la moyenne du stade correspondant. Pour cette moyenne nous avons choisi les valeurs des embryons mâles telles qu'elles sont données dans le tableau n°3. Par ce moyen ni les écarts entre les valeurs d'un même stade, ni la dispersion de ces valeurs autour de la moyenne ne sont modifiés. Après un tel traitement l'écart moyen entre les mâles et les femelles de 8 à 11 jours est de 3,6% pour les protéines et de 2,9% pour l'ADN. Ces écarts, calculés sur une cinquantaine de mesures sont statistiquement significatifs entre 95 et 99% ($0,01<p<0,05$). Chaque mesure est faite sur un lot de 5 embryons, c'est donc sur un échantillon de 250 embryons de chaque sexe que porte cette différence de contenu en ADN et en protéines. Ce calcul statistique confirme que pour le Canard le contenu en ADN et en protéines des embryons de 8 à 11 jours diffère selon le sexe. Nous avons vu précédemment que le calcul statistique ne peut pas confirmer la validité de cette différence à 7 jours, et qu'à 6 jours l'écart en sens inverse n'est pas non plus significatif. La grande dispersion des valeurs autour des moyennes est la cause de ce résultat qui laisse subsister l'incertitude pour les embryons de Canard de 6 et 7 jours.

Afin de montrer que la dispersion des mesures autour de la moyenne d'un stade n'est pas due à l'erreur des dosages d'ADN et de protéines, mais bien à la variabilité individuelle des embryons, nous donnerons un exemple de la corrélation entre les mesures des quantités de protéines et d'ADN. Le coefficient de corrélation entre les mesures d'ADN et de protéines est de 0,98 pour le Canard de 6 jours. Cette corrélation est donc très nettement positive et ne laisse aucun doute sur l'origine de la dispersion des mesures : les embryons de 6 jours ont des tailles très variables, correspondant à des âges réels différents et à des contenus en ADN et protéines très variables. Une corrélation aussi nettement positive existe à tous les stades étudiés.

Dans ces conditions les difficultés rencontrées pour montrer la signification des différences mesurées s'expliquent par une dispersion réelle des embryons autour du contenu moyen en protéines et en ADN. Cette dispersion est inévitable, mais elle est préférable à celle due aux erreurs de mesure car elle reflète la variabilité individuelle des embryons.

Nous avons vu au paragraphe précédent que, pour le Poulet, les embryons mâles contiennent plus de protéines et d'ADN que les femelles. Cet écart n'est significatif pour aucun stade et ne l'est pas non plus si les embryons du même sexe et d'âge différent sont rassemblés en un seul échantillon comme nous venons de le faire pour le Canard. Cependant, nous pensons pouvoir affirmer que cet écart est bien réel. En effet, comme chez le Canard,la corrélation

entre les mesures d'ADN et de protéines est très nettement positive à tous les stades (exemple : le coefficient de corrélation est de 0,96 à 5 jours). Comme nous l'avons montré pour le Canard, la dispersion des mesures autour de la moyenne est due à la variabilité individuelle et non aux erreurs de mesure. Enfin, l'analogie avec le Canard pour l'ensemble de ces mesures est frappante, sauf pour le début de la période considérée. Elle nous conduit à admettre l'existence d'une différence entre mâle et femelle pour l'embryon de Poulet, comme pour celui de Canard, même si d'après nos résultats elle n'est pas significative. Il n'est pas possible de préciser si cette différence (supériorité des embryons mâles) commence à 7 jours, par analogie avec le Canard, ou si elle existe dès 5 jours comme nos mesures semblent le montrer. Dans ce cas l'évolution des contenus en protéines et en ADN pourrait différer d'une espèce à l'autre au début de l'intervalle étudié.

Une telle différence en rapport avec le sexe n'a jamais été signalée pour l'embryon d'Oiseau. VENZKE (1943) a mesuré le poids des embryons de Poulet à partir de 10 jours, en séparant les mâles et femelles. Les résultats de ce travail ne montrent aucune différence en faveur de l'un ou l'autre sexe. Par contre BRENEMAN (1941) qui a pesé les poussins (Leghorn blanc et Rhode island) entre 5 et 30 jours après l'éclosion trouve que les mâles sont en moyenne plus lourds que les femelles. Cependant aucune comparaison précise entre ces résultats et les notres ne peut être faite en raison de l'éloignement des périodes étudiées. En effet, si après l'éclosion le sexe phénotypique est orienté par les hormones, le rôle de celles-ci est plus incertain aux stades où nous mesurons les premières différences. Même si nous excluons les deux premiers

jours (5 et 6 jours pour le Poulet et 6 et 7 jours pour le Canard) il nous paraît douteux que les hormones aient, si tôt dans le développement, une influence mesurable sur la croissance globale des embryons. Il nous semble plus probable qu'une cause liée directement au sexe génotypique soit à l'origine de ces différences. L'absence d'un chromosome Z chez la femelle, remplacé par un petit chromosome W, diminue probablement le contenu en ADN des noyaux femelles par rapport aux mâles. Il s'en suit qu'à nombre de cellules égal, l'embryon mâle contiendra plus d'ADN que la femelle. Cette coincidence peut être fortuite et n'explique pas la différence entre les embryons de Canard de 6 jours, où la femelle contient plus d'ADN que le mâle. C'est cependant une explication possible pour ce phénomène que nous avons mis en évidence.

III -- CONCLUSION

La comparaison de la croissance corporelle des embryons de Poulet et de Canard, mesurée par les quantités de protéines et d'ADN nous permet d'établir les faits suivants :

- le type de croissance est le même dans les deux espèces : croissance de forme exponentielle avec diminution du taux d'accroissement au cours du développement ;
- les embryons s'enrichissent plus en protéines qu'en ADN pendant la période étudiée, et ce phénomène est parallèle dans les deux espèces;
- pour une même quantité de protéines l'embryon de Canard contient à tous les stades plus d'ADN que celui de Poulet ;

- les embryons mâles contiennent plus de protéines et d'ADN que les femelles entre 7 et 11 jours pour le Poulet et entre 8 et 11 jours pour le Canard. Cette différence est peut-être déjà établie 1 ou 2 jours plus tôt.

Les mesures de la croissance corporelle des embryons que nous venons de présenter seront reprises dans la deuxième partie pour décrire la croissance allométrique des gonades pendant la même période du développement.

DEUXIEME PARTIE

CROISSANCE DES GONADES EMBRYONNAIRES DE POULET ET DE CANARD

La croissance des gonades embryonnaires d'oiseaux, de même que celle du corps des embryons, a été mesurée par l'augmentation du poids (SCHMALHAUSEN, 1926 ; BRENEMAN, 1941 ; VENZKE, 1943). Un travail plus récent (MITTWOCH et coll., 1971) a porté sur la mesure du volume des gonades embryonnaires du Poulet. D'autres auteurs se sont intéressés à des aspects plus limités de la croissance globale des gonades.

S'il existe quelques travaux sur la croissance des gonades de Poulet, nous n'en avons trouvé aucun sur le Canard.

La plupart des résultats publiés sur la croissance des gonades de Poulet sont sans rapport avec la différenciation sexuelle : les mesures de VENZKE (1943), commencent seulement à 10 jours et celles de SCHMALHAUSEN ne précisent pas le sexe (1926) ou sont incomplètes (cité par ROMANOFF, 1960). Seuls MITTWOCH et coll. (1971) ont réalisé leur travail afin de décrire quantitativement la croissance au cours de la différenciation sexuelle. Leurs mesures du volume des gonades semblent assez précises, mais portent sur un petit nombre de cas.

Nous avons commencé l'étude de la croissance des gonades par la mesure du volume des organes frais. Nous n'avons pu en limiter les erreurs et nous avons donc renoncé rapidement à ces mesures. Le choix des dosages biochimiques de l'ADN et des protéines a été fait à cause de la précision des mesures et de l'intérêt de ces composants de la matière vivante dans la croissance des organes. Ainsi nous pourrons substituer des mesures précises à l'observation morphologique de la croissance asymétrique des gonades. Cette asymétrie, nettement plus prononcée chez la femelle que chez le mâle, est un des signes les plus précoces et les plus évidents de la différenciation sexuelle, et nous espérons ainsi accroître notre connaissance de ce phénomène dans une direction que seuls MITTWOCH et coll.(1971) ont suivie jusqu'à maintenant.

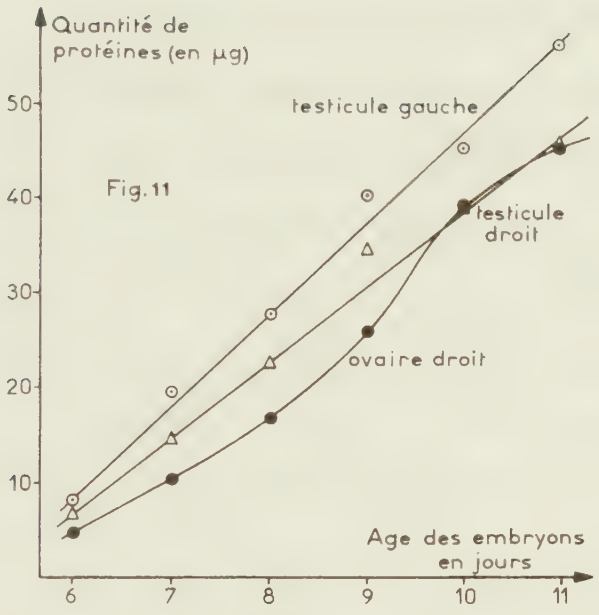
I -- CROISSANCE DES GONADES DE POULET

A - Résultats

La croissance des gonades de l'embryon de Poulet a été mesurée entre 6 et 11 jours. Avant 6 jours il n'est pas possible de prélever les gonades en entier et sans contamination par du mésonéphros, car les deux organes sont encore trop étroitement liés.

1. Protéines

Les quantités moyennes de protéines contenues dans les gonades sont données dans le tableau n° 6. Les courbes des figures n° 11 et 12 ont été tracées à partir de ces valeurs, soit en coordonnées normales soit en coordonnées semi-logarithmiques.



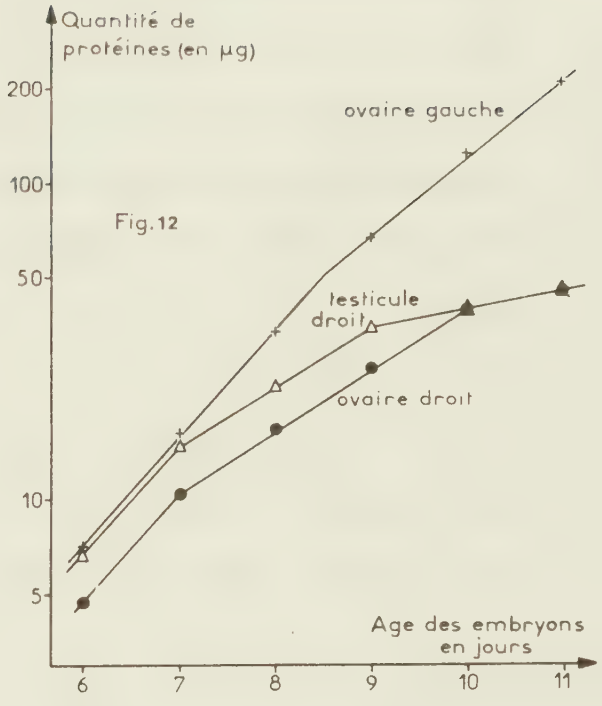


Fig. n° 11 : Embryon de Poulet. Courbe de croissance en protéines des testicules et de l'ovaire droit. Coordonnées normales.

Fig. n° 12 : Embryon de Poulet. Courbes de croissance en protéines des ovaires et du testicule droit. Coordonnées semi-logarithmiques.

La courbe de croissance de l'ovaire gauche n'est pas représentée sur la figure n° 11, car son ascension est trop rapide par rapport aux autres gonades. Son tracé en coordonnées semi-logarithmiques (fig. 12) est presque rectiligne et montre seulement un léger fléchissement vers le bas pendant le 9e jour. La croissance de l'ovaire gauche est donc très nettement de type exponentiel, mais elle se ralentit un peu vers 10 et 11 jours. L'ovaire droit s'accroît autant que le gauche

de 6 à 7 jours, mais beaucoup plus lentement ensuite. En coordonnées normales la courbe est de forme sigmoïde très aplatie (fig. 11). Les testicules ont une croissance en protéines qui semble linéaire pendant toute la période étudiée. Le testicule droit s'accroît autant que l'ovaire gauche entre 6 et 7 jours (fig. 12) et que l'ovaire droit entre 10 et 11 jours. Cet exemple illustre bien la divergence rapide entre la croissance exponentielle de l'ovaire gauche et la croissance linéaire du testicule droit : partant de valeurs presque égales à 6 jours, le contenu en protéines de ces deux gonades est à 11 jours dans un rapport de 1 à 4,7.

Les taux quotidiens de la croissance en protéines sont donnés dans le tableau n° 5. Ils traduisent en chiffres les particularités des courbes de croissance que nous venons de décrire.

Période	♀ Gauche	♀ Droite	♂ Gauche	♂ Droite
6 à 7 j.	0,64	0,65	0,58	0,61
7 à 8 j.	0,64	0,44	0,37	0,43
8 à 9 j.	0,65	0,37	0,27	0,30
9 à 10 j.	0,56	0,37	0,21	0,22
10 à 11 j.	0,55	0,19	0,18	0,15

TABLEAU n° 5 : Gonades de Poulet. Taux d'accroissements quotidiens des quantités de protéines, calculés à partir des valeurs estimées sur les courbes de croissance (fig. 11 et 12).

Comme pour les embryons, ils ont été calculés par la méthode de LAIRD (1965) à partir des valeurs estimées sur les courbes. On peut comparer la diminution rapide et continue du taux d'accroissement dans les testicules (de 0,60 à 0,15 ou 0,20) et la diminution très faible dans l'ovaire gauche (de 0,64 à 0,55).

Les quantités de protéines mesurées dans les gonades de Poulet de 6 et 7 jours (tableau n° 6) sont remarquables par les différences qui existent entre les quatre types de gonades : ovaires et testicules,

Age en jours	Nombre ♀	Nombre ♂	♀ Gauche	♀ Droite	♂ Gauche	♂ Droite
6 j.	126	138	7,15	4,79	8,30	6,66
7 j.	70	65	16,4	10,5	19,2	14,7
8 j.	70	75	33,9	16,8	27,9	22,6
9 j.	60	50	68,6	26,1	40,5	34,8
10 j.	60	55	128,5	39,7	45,7	39,4
11 j.	45	45	216	45,8	56,8	46,2

TABLEAU n° 6 : Gonades de Poulet. Quantités de protéines en microgrammes par gonade.
Nombre : nombre d'organes utilisés pour les mesures.

gauche et droite. Au même âge, le testicule contient plus de protéines que l'ovaire du même côté, et la gonade gauche contient plus de protéines que la droite du même sexe. La signification statistique de ces diffé-

rences est établie par le test d'homogénéité effectué sur les 4 échantillons (LAMOTTE, 1957, page 97). A 6 jours comme à 7 jours, la probabilité pour que les 4 échantillons de mesures correspondant aux 4 types de gonades, proviennent d'une seule population est inférieure à 1 % ($p < 0,01$). On peut donc dire que, à âge égal, les contenus en protéines des 4 types de gonades sont distincts les uns des autres. On peut illustrer cette différence en établissant un diagramme de points ayant pour abscisse la quantité moyenne de protéines contenue dans la gonade gauche et pour ordonnée celle de la gonade droite du même lot d'embryons (voir matériel et techniques). On voit sur la figure n° 13 que le nuage des points représentant les embryons mâles de 6 jours se distingue sans ambiguité de celui des embryons femelles du même âge. L'échantillon des

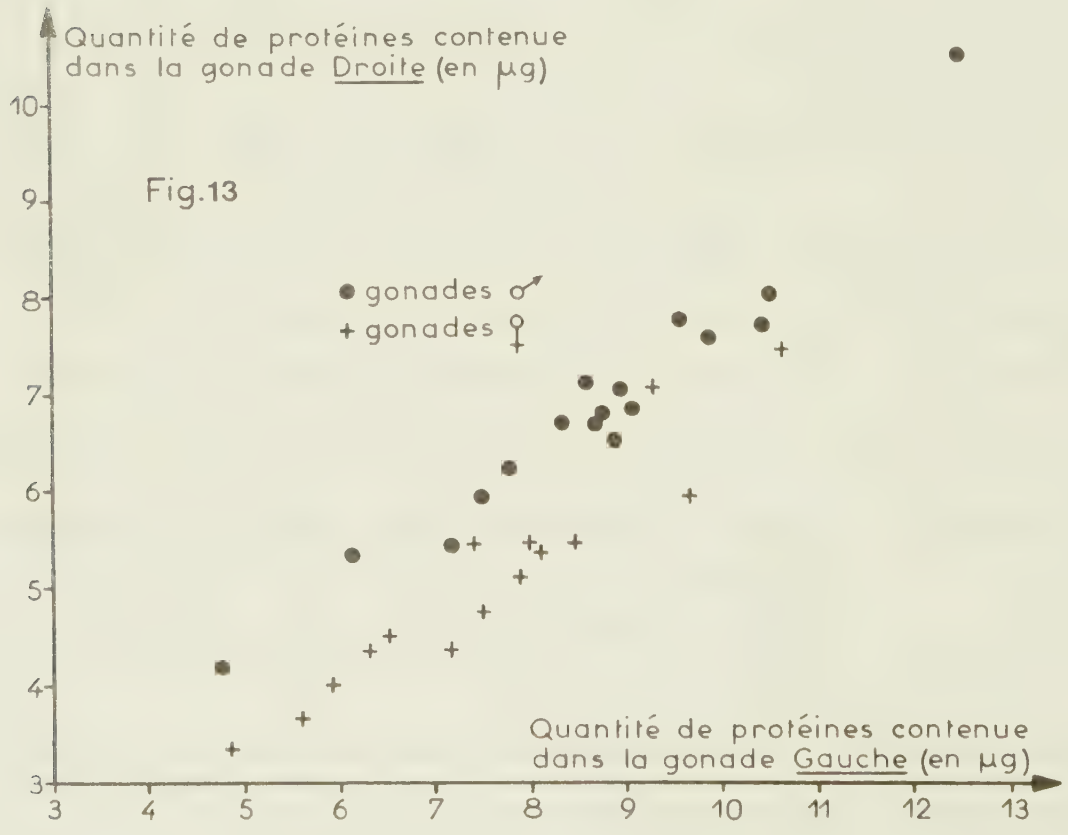


Fig. n° 13 : Diagramme des quantités de protéines contenues dans les gonades d'embryons de Poulet de 6 jours. Chaque lot d'embryons est représenté par un point dont l'abscisse est le contenu de la gonade gauche et l'ordonnée celui de la gonade droite.

embryons mâles diffère donc de l'échantillon des femelles pour les données portées en abscisses et en ordonnées, c'est-à-dire pour les quantités de protéines contenues dans les gonades à 6 jours. Le bon alignement des points du diagramme (fig. n° 13) montre que la corrélation entre les valeurs à gauche et à droite d'un même embryon est nettement positive et que la variabilité individuelle des embryons l'emporte sur les erreurs de mesures. La corrélation entre les valeurs à gauche et à droite et la faiblesse des erreurs de mesures permettent d'établir la signification statistique des différences mesurées entre les gonades.

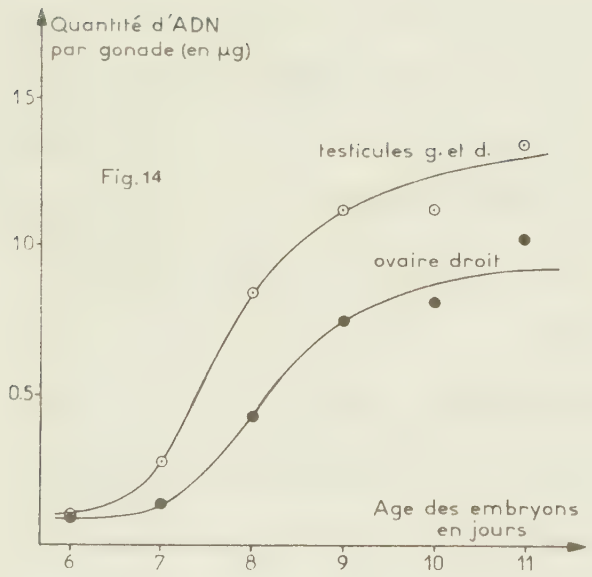
Nous pouvons donc affirmer qu'il existe une différence entre les contenus en protéines des 4 types de gonades de l'embryon de Poulet de 6 jours. Nous avons aussi montré par le calcul statistique que cette différence se maintient à 7 jours. Ensuite, la simple observation morphologique suffit à confirmer les écarts constatés par nos mesures.

Enfin, nous pouvons faire deux remarques à partir des valeurs du tableau n° 6. D'une part le contenu en protéines de l'ovaire gauche dépasse celui du testicule gauche seulement au cours du 8e jour. D'autre part, l'ovaire doit s'accroit encore sensiblement au cours du 11e jour et on ne peut pas parler de régression puisque cette croissance est égale à celle des testicules. Il y a seulement un fort ralentissement de la croissance de l'ovaire droit.

2. ADN

Les valeurs moyennes des mesures de l'ADN contenu dans les gonades de Poulet sont données dans le tableau n° 7. Les courbes des figures n° 14 et 15 ont été établies à partir de ces valeurs.

La croissance en ADN de l'ovaire gauche est de type exponentiel entre 8 et 11 jours. De 6 à 7 jours la croissance est lente, puis très rapide de 7 à 8 jours. Les variations brusques de la vitesse de croissance correspondent probablement à des particularités du développement des tissus de l'ovaire gauche. Les valeurs du rapport $\frac{\text{protéines}}{\text{ADN}}$ reflètent ces phénomènes que nous essaierons d'expliquer après avoir décrit la croissance en ADN de l'ovaire droit et des tes-



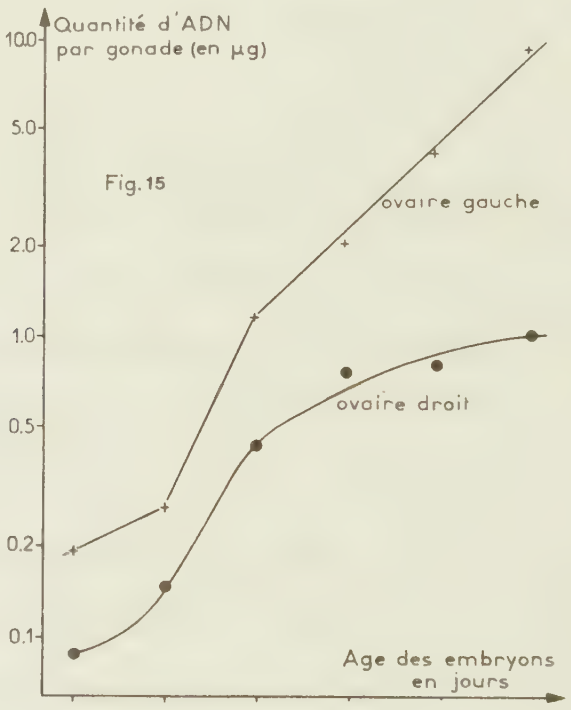


Fig. n° 14 : Embryon de Poulet. Courbes de croissance en ADN des testicules et de l'ovaire droit. Coordonnées normales.

Fig. n° 15 : Embryon de Poulet. Courbes de croissance en ADN des ovaires. Coordonnées semi-logarithmiques.

ticules. Cette croissance est de forme sigmoïde en coordonnées normales (fig. n° 14). La quantité d'ADN s'accroît moins vite dans l'ovaire droit que dans les deux testicules (une seule courbe a été représentée pour les deux gonades mâles), notamment entre 6 et 8 jours. On peut aussi remarquer le maintien de la croissance en ADN de l'ovaire droit pendant le 11e jour. Il n'y a donc pas de régression de cette gonade comme nous l'avions déjà noté d'après les mesures des quantités de protéines.

Age en jours	Nombre ♀	Nombre ♂	♀ Gauche	♀ Droite	♂ Gauche	♂ Droite
6 j.	126	138	0,197	0,089	0,116	0,104
7 j.	70	65	0,270	0,146	0,295	0,264
8 j.	70	75	1,165	0,433	0,899	0,786
9 j.	60	50	2,07	0,757	1,16	1,085
10 j.	60	55	4,07	0,811	1,35	0,885
11 j.	45	45	9,24	1,022	1,54	1,135

TABLEAU n° 7 : Gonades de Poulet. Quantités d'ADN en microgrammes par gonade.
Nombre : nombre d'organes utilisés pour les mesures.

Les quantités d'ADN mesurées à 6 et 7 jours (tableau n° 7) montrent une asymétrie prononcée entre les ovaires et peu importante entre les testicules. Le testicule droit contient un peu moins d'ADN que le gauche, et cet écart persiste pendant toute la période étudiée.

A 6 jours l'ovaire droit contient un peu moins d'ADN que les gonades mâles, mais surtout deux fois moins que l'ovaire gauche. A 7 jours cette différence entre les ovaires est légèrement atténuée, mais elle s'accroît à nouveau dans les jours suivants.

Bien que la signification statistique de ces écarts ne puisse être montrée, à cause du petit nombre de mesures, on peut admettre que l'asymétrie de la quantité d'ADN contenue dans les deux gonades d'un embryon de 6 jours est caractéristique de son sexe. En effet, l'importance de ce caractère chez la femelle la distingue du mâle sans confusion possible. Cette différence de degré d'asymétrie que l'on peut constater morphologiquement dans la suite du développement est un caractère précoce qui dépend du sexe.

Nous venons d'examiner séparément la croissance en ADN et en protéines. Les deux séries de mesures ayant été faites sur les mêmes organes, il est intéressant de les rapprocher afin de comparer leur évolution. Pour cela, nous avons calculé les valeurs du rapport $\frac{\text{protéines}}{\text{ADN}}$ qui donne pour chaque gonade, à tous les âges étudiés, la quantité de protéines pour une même quantité d'ADN (tableau n° 8). Une seule valeur a été calculée pour les deux testi-

Age en jours	Nombre ♀	Nombre ♂	♀ Gauche	♀ Droite	♂ Gauche et Droite
6 j.	126	138	36	54	68
7 j.	70	65	61	72	61
8 j.	70	75	29	39	30
9 j.	60	50	33	35	33
10 j.	60	55	32	49	38
11 j.	45	45	23	45	39

TABLEAU n° 8 : Gonades de Poulet. Valeurs du rapport $\frac{\text{protéines}}{\text{ADN}}$.
Nombre : nombre d'organes utilisés pour les mesures.

cules en raison de leur similitude. A tous les âges la valeur de ce rapport pour l'ovaire gauche est plus faible que pour l'ovaire droit et inférieure ou égale à celle des testicules. C'est-à-dire que l'ovaire droit est relativement plus riche en protéines que le gauche et que les testicules pendant presque toute cette période. On remarque la brusque augmentation du rapport pour l'ovaire gauche entre 6 et 7 jours, ce qui est le signe d'une croissance en protéines plus rapide que celle de l'ADN.

On ne peut relier précisément ces observations aux autres événements connus qui se déroulent dans cet intervalle, mais nous pouvons dire que les signes histologiques de la différenciation sexuelle s'accompagnent de modifications biochimiques importantes qui se traduisent par des variations du rapport $\frac{\text{protéines}}{\text{ADN}}$.

B - Discussion

Parmi les mesures que nous avons effectuées, celles qui montrent entre les gonades des différences précoces nous intéressent particulièrement.

MITTWOCH et coll.(1971) ont obtenu des résultats semblables en mesurant le volume des gonades de Poulet sur des coupes histologiques, entre 5 et 10 jours. Leurs mesures montrent la supériorité du volume de la gonade gauche par rapport à la droite, mais surtout la supériorité du volume du testicule par rapport à l'ovaire du même côté, à 5, 6 et 7 jours. Ce résultat est identique à celui de nos mesures des quantités de protéines à 6 et 7 jours. Il n'est pas possible de faire nos mesures à 5 jours, mais la similitude avec celles du volume et le caractère très marqué des différences constatées à 6 jours, nous fait penser que le contenu en protéines des gonades diffère selon leur sexe avant 6 jours. Les écarts mesurés entre les quantités d'ADN renforcent cette présomption. On peut donc dire que nos résultats concordent en tous points avec ceux de MITTWOCH

et coll.. Malgré cela, notre interprétation de ces faits est complètement différente de la leur, telle qu'elle a été exposée à plusieurs reprises (MITTWOCH et coll.,1969 ; MITTWOCH,1971; MITTWOCH et BUEHR,1973).

Les quantités de protéines et d'ADN, caractéristiques du sexe par leur valeur absolue et le degré d'asymétrie gauche-droite, sont la conséquence d'une croissance dont les mécanismes régulateurs de l'intensité dépendant du sexe de l'embryon. Ces différences, apparues avant 6 jours dans la synthèse des protéines et de l'ADN, sont un signe de différenciation sexuelle des gonades au même titre que les phénomènes considérés habituellement comme les caractères de cette différenciation (voir bibliographie dans GASC,1974). Cette conclusion se déduit simplement de nos résultats.

Que ce signe de différenciation soit instable, puisque la croissance de l'ovaire gauche dépasse rapidement celle des autres gonades, ou paraisse mineur par rapport aux autres caractères sexuels des gonades, ne permet pas de le considérer à part, comme sans intérêt ni importance.

C'est pourtant ce que font MITTWOCH et coll.(1971) qui, ayant constaté l'existence des différences précoces que vous avons décrites, en font les signes d'une différenciation transitoire. Pour ces auteurs, la croissance rapide d'une gonade est obligatoirement liée à la différenciation ovarienne qui commence donc seulement à 8 jours lorsque l'ovaire gauche dépasse en volume les autres gonades. Ce qui a lieu avant cet âge fait partie de la différenciation transitoire dont ces auteurs ne tiennent pas compte, car elle n'est pas, selon eux, en rapport avec les signes de la différenciation sexuelle définitive. Or, nous avons montré par nos mesures que l'asymétrie gauche-droite des gonades femelles est bien un caractère quantitatif lié au sexe qui existe à 6 jours, et s'accroît ensuite au point de

devenir perceptible par la simple observation morphologique à 8 jours.

Aucune particularité n'apparaît donc à 8 jours qui permettrait de fixer une étape importante du développement à ce stade. MITTWOCH et coll. ont probablement été induits en erreur par le nombre insuffisant de leurs mesures. A cause de cela, ils négligent les résultats des premiers stades étudiés et affirment que la croissance rapide de l'ovaire gauche est responsable de sa différenciation sexuelle. Pour ces auteurs, le rôle majeur dans la différenciation sexuelle est tenu par la croissance qui forme un ovaire ou un testicule suivant que la gonade indifférenciée se développe plus ou moins vite. Les implications de cette théorie dans les domaines étrangers à notre travail nous interdisent de la critiquer dans son ensemble. Nous ne pouvons pas discuter le rôle du sexe génétique dans le contrôle de la croissance, ni la signification des résultats obtenus par MITTWOCH ET BUEHR(1973)sur la souris "sex-reversed", mais nous devons dire notre désaccord complet sur l'interprétation des mesures de la croissance gonadique de l'embryon de Poulet. Les résultats de MITTWOCH et coll. contredisent leur théorie, sauf si la possibilité d'une différenciation sexuelle précoce est rejetée "a priori". C'est ce que ces auteurs font arbitrairement et que nous n'acceptons pas. Chaque différence liée au sexe est un signe de différenciation sexuelle même s'il est sans rapport apparent avec les autres signes connus. C'est par l'ensemble de ces différences, mises en place progressivement au cours du développement que le sexe phénotypique s'établit, distinguant de plus en plus nettement et définitivement les mâles et les femelles. Chaque caractère distinctif a sa place et son importance, même s'il est précoce et labile.

II -- CROISSANCE DES GONADES DE CANARD

A - Résultats

Les quantités d'ADN et de protéines contenues dans les gonades de Canard ont été mesurées entre 7 et 11 jours. Cette période recouvre les mêmes étapes du développement que pour le Poulet, sauf à la fin où elle s'arrête un jour plus tôt.

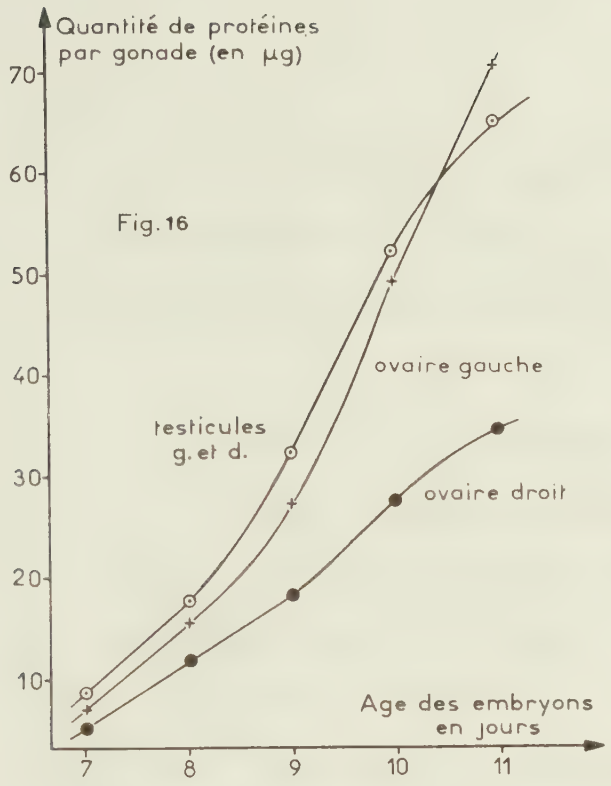
1. Protéines

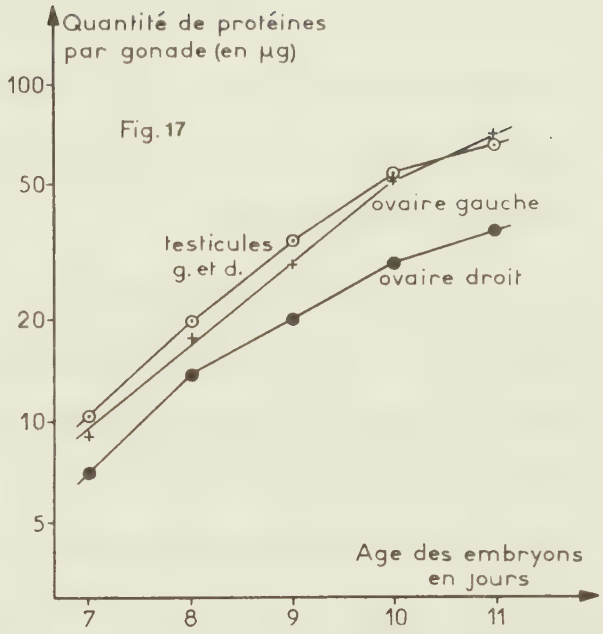
Les moyennes des mesures de protéines données dans le tableau n° 9 ont été utilisées pour tracer les courbes des figures n° 16 et 17.

Age en jours	Nombre ♀	Nombre ♂	♀ Gauche	♀ Droite	♂ Gauche	♂ Droite
7 j.	133	112	9,15	6,97	11,5	9,33
8 j.	55	65	17,5	13,7	20,8	18,3
9 j.	92	81	29,3	20,0	35,5	33,2
10 j.	75	65	51,3	29,6	56,6	51,4
11 j.	63	61	72,4	36,5	69,9	64,6

TABLEAU n° 9 : Gonades de Canard. Quantités de protéines en microgrammes par gonade.
Nombre : Nombre d'organes utilisés pour les mesures.

La croissance en protéines de l'ovaire gauche est de type exponentiel entre 7 et 10 jours, puis elle se ralentit pendant le 11e jour. Pour l'ovaire droit la courbe est presque rectiligne en coordonnées normales : il y a cependant une accélération de la croissance entre 9 et 10 jours. Entre 7 et 10 jours la croissance des testicules (une seule courbe moyenne a été tracée) est parallèle à celle de l'ovaire





Gonades de Canard. Courbe de croissance en protéines des ovaires et des testicules. Coordonnées normales (fig. 16) et semi-logarithmiques (fig. 17).

gauche et les quantités de protéines sont légèrement supérieures à celles mesurées pour cette gonade. Pendant le 11e jour la croissance se ralentit plus encore dans les testicules que dans l'ovaire gauche, dont le contenu en protéines dépasse alors celui des gonades mâles.

Le tableau 10 exprime ces différences de pentes en taux quotidiens d'accroissement des quantités de protéines. Ces taux

Période	♀ Gauche	♀ Droite	♂ Gauche et Droite
7 à 8 j.	0,53	0,62	0,58
8 à 9 j.	0,53	0,36	0,52
9 à 10 j.	0,52	0,38	0,42
10 à 11 j.	0,32	0,19	0,22

TABLEAU n° 10 : Gonades de Canard. Taux d'accroissements quotidiens des quantités de protéines dans les gonades, calculés à partir des valeurs estimées sur les courbes de croissance (fig. 16 et 17)

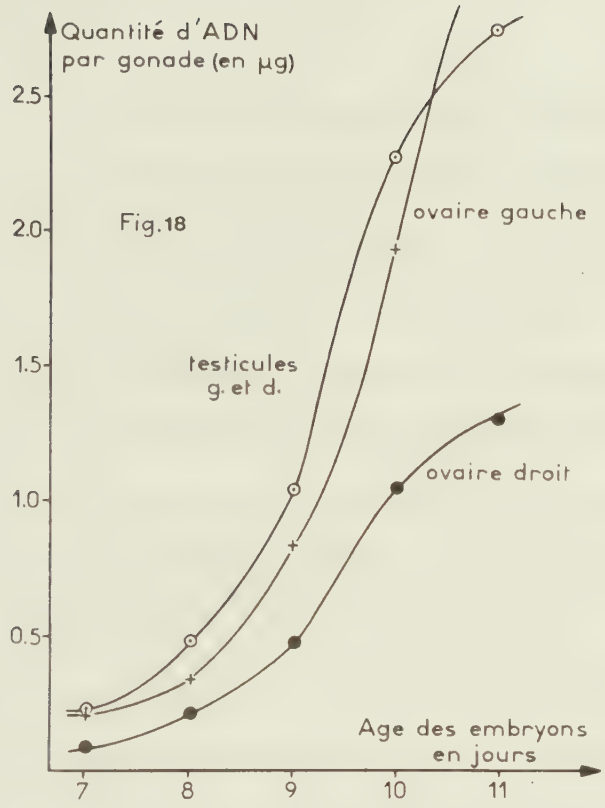
ont été calculés par la méthode de LAIRD (1965) à partir des estimations faites sur les courbes (fig. 16 et 17). On remarque la diminution du taux de croissance plus lente et plus faible dans l'ovaire gauche que dans les autres gonades.

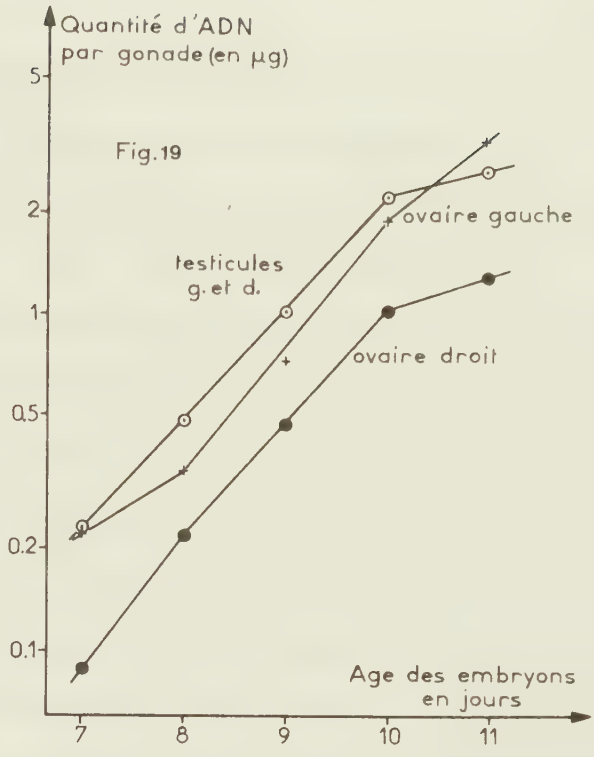
Les valeurs du tableau n° 9 montrent qu'à tout moment entre 7 et 10 jours le testicule contient plus de protéines que l'ovaire du même côté dans un embryon du même âge, et la gonade gauche d'un embryon plus que la droite. Cette situation se trouvait déjà chez le Poulet de 6 et 7 jours. La supériorité du contenu en protéines des testicules n'est donc pas exceptionnelle, même aux stades jeunes que nous étudions. Chez le Canard elle se maintient longtemps, car c'est seulement pendant le lle jour que le contenu en protéines de l'ovaire gauche devient supérieur à celui des testicules.

Cette différence entre les contenus en protéines des quatre types de gonades est particulièrement intéressante pour les plus jeunes stades étudiés. A 7 jours, chez le Canard, aucun caractère ne marque le sexe des gonades. Or nos mesures montrent que le contenu protéique des gonades d'un embryon de 7 jours dépend de son sexe génétique. D'après le test d'homogénéité effectué sur les quatre types de gonades simultanément, il est très peu probable ($p < 0,01$) que les quatre séries de mesures correspondantes proviennent par hasard d'une même population. On peut donc dire que les différences mesurées entre les gonades à 7 jours sont statistiquement significatives. Il en est de même à 8 jours.

2. ADN

Dans le tableau n° 11 sont données les moyennes des mesures des quantités d'ADN contenues dans les gonades de Canard. Ces valeurs





Gonades de Canard. Courbes de croissance en ADN des ovaires et des testicules. Coordonnées normales (fig. 18) et semi-logarithmiques (fig. 19).

ont permis de tracer les courbes de croissance en ADN des figures n° 18 et 19. La forme générale des courbes est assez semblable pour les quatre types de gonades, qui cependant diffèrent dès le début par leur contenu en ADN. En coordonnées normales (fig. 18), les courbes sont sigmoïdes, c'est-à-dire que la croissance est accélérée pendant la première partie (7 à 9 jours) puis ralentie pendant la deuxième (10 et 11 jours). En coordonnées semi-logarithmiques, la première partie est rectiligne et la deuxième partie est marquée par la diminution importante de la pente, surtout dans l'ovaire droit et les testicules. Par rapport à ces gonades, l'ovaire gauche a une croissance en ADN plus lente entre 7 et 8 jours, égale entre 8 et 9 jours, et plus rapide entre 10 et 11 jours.

Si la forme des courbes diffère peu d'une gonade à l'autre, les valeurs du contenu en ADN sont nettement distinctes (tableau n° 11).

Age en jours	Nombre ♀	Nombre ♂	♀ Gauche	♀ Droite	♂ Gauche	♂ Droite
7 j.	133	112	0,222	0,091	0,239	0,224
8 j.	55	65	0,343	0,220	0,509	0,456
9 j.	92	81	0,743	0,483	1,15	0,930
10 j.	75	65	1,94	1,05	2,39	2,17
11 j.	63	61	3,34	1,31	2,91	2,61

TABLEAU n° 11 : Gonades de Canard. Quantités d'ADN en microgrammes par gonade.
Nombre : nombre d'organes utilisés pour les mesures.

La valeur moyenne des deux testicules est supérieure à celle de l'ovaire gauche, jusqu'à 10 jours. C'est seulement pendant le 11e jour que, grâce à une croissance peu ralentie, le contenu en ADN de l'ovaire gauche dépasse celui des testicules. L'ovaire droit contient toujours beaucoup moins d'ADN que les autres gonades pendant toute cette période. Aux stades âgés, cette différence reflète l'asymétrie très prononcée des ovaires, aisément visible par l'observation morphologique. Mais pour les stades jeunes cela montre la précocité de ces différences et particulièrement à 7 jours où l'asymétrie morphologique est apparemment égale dans les deux sexes. L'écart entre les deux ovaires à 7 jours est suffisamment grand pour que, malgré l'absence de preuve statistique, son existence ne puisse être mise en doute.

Nous avons déjà remarqué de tels écarts entre les gonades embryonnaires de Canard, pour leur contenu en protéines. Cependant ces deux séries de mesures, protéines et ADN, ne donnent pas les mêmes valeurs à ces écarts entre différents types de gonades. Ce phénomène traduit une richesse relative en protéines propre à chaque gonade, et s'exprime assez bien par le rapport $\frac{\text{protéines}}{\text{ADN}}$ dont les valeurs sont données dans le tableau n° 12. A 7 jours l'ovaire droit est, relativement à la quantité d'ADN, plus riche en protéines que l'ovaire gauche et les testicules. Cette différence est encore un caractère qui montre la précocité des premiers signes de la différenciation sexuelle. Ensuite le rapport $\frac{\text{protéines}}{\text{ADN}}$ diminue dans les quatre types de gonades mais reste toujours le plus grand dans l'ovaire droit.

Age en jours	Nombre ♀	Nombre ♂	♀ Gauche	♀ Droite	♂ Gauche et Droite
7 j.	133	112	41	76	45
8 j.	55	65	51	62	40
9 j.	92	81	39	41	33
10 j.	75	65	26	28	24
11 j.	63	61	22	28	24

TABLEAU n° 12 : Gonades de Canard. Valeurs du rapport $\frac{\text{protéines}}{\text{ADN}}$. Nombre : Nombre de gonades utilisées pour les mesures.

B - Discussion

Les résultats que nous venons d'exposer pour le Canard confirment ceux que nous avons obtenus précédemment avec le Poulet. Ils apportent un nouvel argument en faveur de l'interprétation que nous en avons donnée. Dans les deux espèces les écarts entre les quantités de protéines contenues dans les gonades à gauche et à droite, chez le mâle et chez la femelle, sont statistiquement significatifs et les valeurs de ces quantités sont des caractéristiques du sexe. Cela montre qu'il existe une certaine dépendance de la croissance des gonades, avant le début de la période étudiée, à l'égard du sexe génétique de l'embryon. On peut donc dire que la différenciation seuxelle de la croissance est commencée à 6 jours pour le Poulet et à 7 jours pour le Canard. Les mesures des quantités d'ADN font aussi ressortir ce résultat, mais montrent une différence entre les deux espèces étudiées : chez le Poulet les testicules contiennent un peu plus d'ADN que l'ovaire droit mais beaucoup moins que l'ovaire gauche, tandis que chez le Canard les testicules contiennent autant d'ADN que l'ovaire gauche, c'est-à-dire deux fois plus que l'ovaire droit.

On retrouve un peu cette différence interspécifique pour les contenus en protéines et cela se traduit dans la morphologie des gonades : les testicules de Canard ont des dimensions proches de celles de l'ovaire gauche, et ceux du Poulet proches de l'ovaire droit. Il existe aussi d'autres caractères distinctifs, indépendants des dimensions, tels que l'aspect, la forme ou la couleur des gonades.

Dans la discussion des résultats obtenus sur les gonades de Poulet nous avons exposé les raisons de notre désaccord avec l'interprétation donnée par MITTWOCH et coll.(1971)à leurs propres résultats. Nous avons dit qu'une étape transitoire de différenciation, définie comme la période pendant laquelle le volume des testicules est supérieur à celui de l'ovaire gauche, n'est nullement nécessaire pour expliquer ou interpréter nos résultats. Les mesures faites sur le Canard apportent un nouvel argument à notre réfutation. En effet nous avons vu que les quantités d'ADN et de protéines contenues dans les testicules de Canard sont supérieures à celles de l'ovaire gauche jusque pendant le 11e jour. C'est seulement à 11 jours que l'ovaire gauche l'emporte sur les testicules, c'est-à-dire bien plus tard que la mise en place d'autres signes histologiques, enzymatiques ou hormonaux de la différenciation sexuelle. L'étape transitoire proposée par MITTWOCH et coll. s'achèverait donc, chez le Canard, après le commencement de la différenciation définitive marquée, entre autres caractères, par la forte asymétrie des ovaires. Il nous paraît donc tout à fait impossible d'expliquer la différenciation sexuelle des gonades d'oiseaux par la croissance plus rapide de l'ovaire gauche, gonade fonctionnelle du sexe hétérogamétique.

Les résultats de MITTWOCH et coll. montrent, comme les nôtres, que la croissance des gonades est un signe précoce de la différenciation sexuelle embryonnaire, mais aucun argument ne prouve la valeur déterminante de ce signe sur l'ensemble des autres caractères qui concourent à la sexualisation progressive des gonades.

Si nos résultats montrent le contrôle de la croissance des gonades par le sexe génétique, les voies de ce contrôle restent entièrement inconnues, de même que les rapports entre la croissance et les autres signes de la différenciation sexuelle.

III -- CROISSANCE RELATIVE DU CORPS ET DES GONADES DE L'EMBRYON DE POULET ET DE CANARD.

Dans la première partie de ce travail nous avons donné les résultats de nos mesures de la croissance corporelle des embryons. Dans les chapitres I et II de la 2e partie, nous avons décrit la croissance des gonades prélevées pour la plupart sur les embryons utilisés pour les mesures de la croissance corporelle. Le rapprochement de ces deux ensembles de mesures, réalisées en grande partie sur les mêmes animaux, étend l'intérêt propre à chacune d'elle à celui de la croissance relative d'un organe par rapport à l'embryon entier. Cette croissance relative est un cas particulier de ce que HUXLEY et TEISSIER (1936)ont décrit sous le nom général d'allométrie ou croissance allométrique.

La mesure de cette croissance allométrique peut s'exprimer par le coefficient d'allométrie que l'on peut définir simplement comme le rapport des taux d'accroissement du même élément de la croissance dans deux organes différents (VIGNERON,1972). Dans notre cas, l'un des organes est le corps de l'embryon.

Nous avons calculé les coefficients d'allométrie à partir des taux d'accroissements quotidiens estimés sur les courbes de croissance du corps de l'embryon et de ses gonades, comme pour les valeurs données dans les tableaux n° 2, 5 et 10.

A. - POULET

Les valeurs du coefficient d'allométrie pour le Poulet sont données dans les tableaux n° 13 et 14. Dans le premier tableau (n° 13) le coefficient est calculé pour la croissance en protéines des gonades par rapport au corps de l'embryon, et dans le second pour l'ADN (n° 14).

Période	♀ Gauche	♀ Droite	♂ Gauche	♂ Droite
6 à 7 j.	1,05	1,07	0,95	1,00
7 à 8 j.	1,09	0,75	0,63	0,73
8 à 9 j.	1,67	0,95	0,69	0,77
9 à 10 j.	1,44	0,95	0,54	0,56
10 à 11 j.	1,34	0,46	0,44	0,37

TABLEAU n° 13 : Gonades et corps des embryons de POULET. Coefficients d'allométrie de croissance en protéines, calculés par le rapport des taux quotidiens d'accroissements en protéines.

Période	♀ Gauche	♀ Droite	♂ Gauche et Droite
6 à 7 j.	0,55	0,91	1,47
7 à 8 j.	2,45	1,86	1,75
8 à 9 j.	1,63	1,26	0,76
9 à 10 j.	1,53	0,37	0,26
10 à 11 j.	1,95	0,18	0,13

TABLEAU n° 14 : Gonades et corps des embryons de POULET. Coefficients d'allométrie de croissance en ADN, calculés par le rapport des taux quotidiens d'accroissements en ADN.

Pour la croissance en protéines le coefficient est toujours supérieur à 1 dans l'ovaire gauche et inférieur ou égal à 1 dans les testicules ; il est supérieur à 1 dans l'ovaire droit pendant le 7e jour, puis devient inférieur à 1. Cela signifie que l'ovaire gauche s'accroît, à tous les stades, plus vite que l'embryon (pour les protéines), et de plus en plus vite avec l'âge. Au contraire l'ovaire droit et les testicules s'accroissent presque toujours moins vite que l'embryon et de moins en moins vite par rapport à lui.

Le coefficient d'allométrie pour l'ADN (tableau n° 14) varie plus brusquement d'un jour à l'autre que celui de la croissance en protéines. Pendant le 7e jour il est très faible pour l'ovaire gauche, presque égal à 1 pour l'ovaire droit et nettement supérieur à 1 pour les testicules. Pendant le 8e jour, il est très élevé pour l'ovaire gauche, et un peu moins élevé pour l'ovaire droit et les testicules. Pendant les jours suivants il décroît lentement dans l'ovaire gauche et très rapidement dans les autres gonades.

Par rapport à la croissance en ADN de l'embryon entier, celle de l'ovaire gauche est très lente de 6 à 7 jours, puis rapide de 7 à 11 jours ; celle de l'ovaire droit et des testicules est égale ou plus rapide que celle de l'embryon de 6 à 8 jours, puis devient beaucoup plus lente de 8 à 11 jours.

B. - CANARD

Les valeurs des coefficients d'allométrie pour la croissance des gonades de Canard par rapport au corps de l'embryon sont données dans les tableaux n° 15 (protéines) et 16 (ADN).

Période	♀ Gauche	♀ Droite	♂ Gauche et Droite
7 à 8 j.	1,06	1,24	1,16
8 à 9 j.	1,08	0,74	1,06
9 à 10 j.	1,13	0,83	0,91
10 à 11 j.	0,97	0,58	0,67

TABLEAU n° 15 : Gonades et corps des embryons de CANARD. Coefficients d'allométrie de croissance en protéines calculés par le rapport des taux quotidiens d'accroissements en protéines.

Période	♀ Gauche	♀ Droite	♂ Gauche et Droite
7 à 8 j.	0,95	1,72	1,53
8 à 9 j.	1,71	1,71	1,62
9 à 10 j.	2,08	1,70	1,63
10 à 11 j.	2,0	0,82	0,64

TABLEAU n° 16 : Gonades et corps des embryons de CANARD. Coefficients d'allométrie de croissance en ADN, calculés par le rapport des taux quotidiens d'accroissements en ADN.

Pendant le 8e jour le coefficient pour les protéines est supérieur à 1 pour les 4 gonades, et légèrement plus élevé pour l'ovaire droit que pour l'ovaire gauche. Il descend en dessous de 1 pendant le

9e jour pour l'ovaire droit, pendant le 10e jour pour les testicules et pendant le 11e jour pour l'ovaire gauche. Cela signifie que la croissance en protéines des gonades est légèrement supérieure à celle de l'embryon entier de 7 à 10 jours pour l'ovaire gauche, de 7 à 9 jours pour les testicules et de 7 à 8 jours pour l'ovaire droit.

Cette évolution est assez différente de celle que nous avons constatée chez le Poulet où le coefficient d'allométrie (protéines) pour les testicules est toujours inférieur à celui de l'ovaire droit (tableau n° 13) .

Le coefficient de croissance allométrique en ADN (tableau n° 16) est un peu inférieur à 1 pour l'ovaire gauche et très supérieur à 1 pour l'ovaire droit et les testicules pendant le 8e jour. Ensuite, les valeurs sont assez proches pour les quatre gonades pendant les 9e et 10e jours, et à nouveau très inégales pendant le 11e jour : seul le coefficient de l'ovaire gauche se maintient au dessus de 1. Cette évolution est voisine de celle que nous avons observée chez le Poulet pour la croissance allométrique en ADN (tableau n° 14) : faiblesse du coefficient de l'ovaire gauche pendant le premier jour étudié, et chute brutale de celui de l'ovaire droit et des testicules à la fin de cette période.

C. - DISCUSSION - CONCLUSION

Le coefficient d'allométrie pour les protéines montre que, chez le Poulet et le Canard, l'ovaire gauche s'accroit plus vite que le corps de l'embryon pendant toute la période étudiée, tandis que cette croissance rapide est limitée aux 1 ou 2 premiers jours pour l'ovaire droit et les testicules.

Cette observation n'est pas un argument en faveur de la théorie de MITTWOCH et coll., car les différences que nous mesurons entre les gonades sont beaucoup plus précoces. Dans cette théorie, l'un des aspects de la différenciation sexuelle est considéré comme la cause unique de ce phénomène, de telles coincidences sont donc normales et conduisent facilement à la confusion.

Le coefficient de croissance allométrique pour l'ADN est très caractéristique du type de gonade pendant le premier jour étudié. Dès le 7ème jour chez le Poulet et le 8ème jour chez le Canard, il est presque 2 fois plus élevé dans l'ovaire droit que dans le gauche. Aux mêmes stades, le coefficient d'allométrie pour les testicules du Poulet et du Canard est nettement supérieur à celui de l'ovaire gauche.

Ces différences sont quantitativement importantes et montrent à nouveau la précocité de la différenciation sexuelle de la croissance des gonades. Elles soulignent aussi la similitude des principaux résultats dans les 2 espèces étudiées.

Cette étude de la croissance allométrique des gonades par rapport au corps de l'embryon est donc un complément utile à nos mesures des quantités d'ADN et de protéines contenues dans les gonades d'Oiseaux.

T R O I S I E M E P A R T I E

SYNTHESE D'ADN DANS LES GONADES DES EMBRYONS DE POULET ET DE CANARD PENDANT LA DIFFERENCIATION SEXUELLE

La croissance des gonades telle que nous venons de la décrire montre l'évolution très rapide des quantités de protéines et d'ADN contenues dans ces organes. Ces quantités augmentent considérablement en une journée et les taux d'accroissement varient beaucoup dans cet intervalle de temps. Les modifications histologiques constatées de jour en jour confirment ces changements rapides que des mesures trop espacées ne peuvent décrire avec précision. Cependant, la grande dispersion des mesures autour des moyennes (voir dans la deuxième partie de ce travail) enlève tout intérêt à des mesures faites à des intervalles de temps plus rapprochés.

Devant cette difficulté nous avons choisi de compléter la mesure des quantités de protéines et d'ADN par celle de la synthèse d'ADN au même âge. Cette synthèse est estimée par l'incorporation d'un précurseur radioactif dans l'ADN. Par ce moyen nous pouvons connaître la quantité d'ADN synthétisée en quelques heures et nous pouvons calculer son taux de synthèse.

La quantité globale d'ADN que nous avons mesurée dans la deuxième partie sera donc complétée par l'accroissement de cette

quantité en quelques heures et par le taux d'accroissement à chaque stade du développement. Par ces mesures nous nous approchons un peu plus des mécanismes responsables de la croissance des gonades.

La mesure de la synthèse d'ADN par l'incorporation de thymidine tritiée (^{3}HTdr) a été souvent utilisée et nous n'en expliquerons pas le principe. Cependant, il est bon d'en évoquer les inconvénients et les incertitudes et de dire notre position à leur égard dans ce travail.

Les critiques de cette technique sont nombreuses. Elles portent soit sur le principe de l'équivalence incorporation - synthèse d'ADN (GOLDSPINK et GOLDBERG, 1973), soit sur les conditions requises pour que cette équivalence soit acceptable (PLAGEMANN et ERBE, 1972 ; CLEAVER, 1967), soit sur l'utilisation de cette technique en culture "in vitro" (SIMNETT et FISHER,1973). Notre travail sur les conditions d'incorporation de ^{3}HTdr dans les gonades en culture d'organe (GASC et LIEBART,1972) a levé une partie de ces objections et a montré que nos conditions expérimentales convenaient techniquement à ce genre d'expérience. Les autres critiques sont en dehors de nos possibilités d'investigation expérimentale et nous ne pouvons pas les discuter. Nous admettrons donc simplement la validité de cette technique en nous basant sur l'universalité de son utilisation mais nous le ferons avec la réserve suivante. L'incorporation de ^{3}HTdr dans les grosses molécules, celles d'ADN, est un résultat et s'exprime en radioactivité incorporée. Mais, parler de synthèse d'ADN à partir de ce résultat est déjà une interprétation qui suppose démontrée l'équivalence quantitative rigoureuse entre incorporation et synthèse d'ADN. Cette démonstration ne pouvant être faite nous parlerons d'incorporation de ^{3}HTdr pour exposer nos résultats et de synthèse d'ADN seulement lorsque nous en interprèterons la signification en termes de croissance

Les résultats des mesures d'incorporation de ^{3}HTdr sont exprimés dans ce travail tels qu'ils ont été obtenus, c'est-à-dire en C.p.m. (coups par minute) rapportés à une gonade. Pour la croissance cela correspond à la synthèse d'une certaine quantité d'ADN dans une gonade en 4 heures de culture.

Les mesures d'incorporation peuvent être rapportées à un élément représentatif de l'état de la gonade au moment de la mesure : les quantités de protéines ou d'ADN. Nous pouvons alors parler de taux d'incorporation, et de taux de synthèse d'ADN et utiliser leurs valeurs pour réaliser une représentation graphique montrant bien les caractéristiques de la croissance de chaque gonade pendant cette période.

I - SYNTHESE D'ADN DANS LES GONADES DE POULET.

Les gonades de l'embryon de Poulet de 6 à 10 jours ont été cultivées "in vitro" en présence de ^{3}HTdr (voir les détails dans Matériel et techniques). Pour des raisons que nous avons déjà mentionnées il n'est pas possible de prélever les gonades avant 6 jours. D'autres techniques sont nécessaires pour l'étude des stades antérieurs à 6 jours, qui fera l'objet de la dernière partie de ce travail.

Le sexe des gonades a été identifié soit par l'examen anatomique (8 à 10 jours) soit par les hétérochromosomes (6 et 7 jours).

Cette période de 6 à 10 jours correspond à la différenciation sexuelle des gonades telle qu'elle est définie par les critères habituels. On voit apparaître successivement les manifestations les plus connues et les plus caractéristiques de la différenciation sexuelle : la première poussée de cordons (VENZKE, 1954 ; WOLFF,Em. et PINOT, 1961), l'apparition des hormones (SCHEIB et HAFFEN, 1974) et des activités enzymatiques correspondantes (SCHEIB et HAFFEN, 1968), l'épaississement de l'épithélium germinatif femelle gauche et la

deuxième poussée de cordons sexuels, enfin, les caractères cytologiques des cellules somatiques et germinales (NARBAITZ et ADLER, 1966 ; DUBOIS et CUMINGE, 1968 ; RAHIL et NARBAITZ, 1972). Au commencement de cette période, à 6 jours, les gonades sont habituellement considérées comme sexuellement indifférenciées. Cependant, nous avons vu dans la deuxième partie de ce travail que ceci n'est pas vrai pour les caractères que nous avons mesurés. Nous attacherons donc une importance particulière aux mesures portant sur les embryons de 6 et 7 jours et à leur signification dans le déroulement de la différenciation sexuelle.

Dans les deux premières parties de ce travail nous avons montré le lien étroit, à l'intérieur d'un groupe de même âge, entre les valeurs de nos mesures et le stade de développement atteint par les embryons. Nous avons expliqué que c'était la cause principale de la dispersion de nos mesures autour des valeurs moyennes. Nous avons rencontré la même difficulté pour les mesures d'incorporation de ^{3}HTdr et nous avons choisi d'y remédier en regroupant les embryons de 6 et 7 jours non pas d'après leur âge en nombre de jours d'incubation, mais d'après le contenu en protéines de leurs gonades. Les lots d'embryons ont été répartis en trois groupes qui, d'après la courbe de croissance en protéines, correspondent approximativement à 5 2/3, 6 1/2 et 7 1/3 jours. Cette nouvelle répartition correspond également aux stades de développement notés au moment du prélèvement des gonades et elle conduit à une dispersion moindre des taux d'incorporation rapportés aux protéines autour des valeurs moyennes. Ces taux varient très rapidement pendant la période 6-7 jours et il est facile de vérifier l'amélioration apportée aux résultats par le classement par quantités de protéines. C'est donc ce classement que nous avons retenu pour les jeunes stades qui deviennent 5 2/3, 6 1/2 et 7 1/3 jours à la place de 6 et 7 jours.

Cette nouvelle distribution crée une difficulté pour les taux d'incorporation de ^{3}HTdr rapportée à la quantité d'ADN. En effet, chaque mesure d'ADN à 6 et 7 jours a été réalisée sur un broyat comprenant plusieurs lots de gonades et à chacun de ces lots correspond une mesure de radioactivité incorporée (voir Matériel et techniques). La répartition des mesures d'ADN entre 5 2/3, 6 1/2 et 7 1/3 jours n'est donc pas possible et les quantités d'ADN contenues dans les gonades à ces stades ne peuvent pas être connues directement. Pour estimer ces quantités il faut passer par l'intermédiaire de la courbe représentant la quantité moyenne d'ADN en fonction de celle de protéines. A chaque type de gonade correspond une courbe qui permet d'estimer la quantité d'ADN en connaissant la quantité de protéines qu'elle contient. Par cet artifice nous avons obtenu les estimations des quantités d'ADN contenues dans les gonades de Poulet à 5 2/3, 6 1/2 et 7 1/3 jours. Bien que les valeurs obtenues soient des estimations et non des mesures directes, elles nous ont semblé préférables à des moyennes de mesures si dispersées, en raison des écarts de stades, qu'elles en auraient perdu tout intérêt. Par ce moyen nous supprimons une cause d'erreur, mais nous ne disposons que d'estimations indirectes à la place de valeurs moyennes de mesures.

A. - RESULTATS.

1. Mesure de la ^{3}HTdr incorporée dans les gonades.

Le tableau n°17 donne les moyennes des mesures de radioactivité incorporée dans les gonades entre 5 2/3 et 10 jours. La radioactivité mesurée correspond à la thymidine incorporée dans l'ADN. Ces valeurs sont reprises pour tracer les courbes de la figure n°20 où une seule courbe moyenne a été tracée pour les deux testicules.

Age en jours	♀ Gauche	♀ Droite	♂ Gauche	♂ Droite
5 2/3	390	350	530	480
6 1/2	620	460	670	570
7 1/3	870	510	910	720
8	1 430	580	780	600
9	2 610	810	870	680
10	3 250	970	900	720

TABLEAU n° 17 : Gonades de Poulet. Incorporation de ^{3}HTdr dans l'ADN, en Cpm par gonade.

Pendant toute cette période, dans les deux sexes, la gonade gauche incorpore plus de ^{3}HTdr que la droite. De 5 2/3 à 7 1/3 jours les testicules incorporent plus que l'ovaire du côté correspondant. A partir de 7 1/3 jours l'incorporation continue de croître rapidement dans l'ovaire gauche tandis qu'elle reste constante dans les testicules, et augmente peu dans l'ovaire droit.

A 5 2/3 jours le test d'homogénéité montre qu'il est très improbable ($p<0,01$) que les 4 échantillons de mesures correspondants aux 4 types de gonades soient issus d'une même population. En particulier on peut montrer que l'écart entre l'ovaire et le testicule gauches (390 et 530 Cpm) et celui entre l'ovaire et le testicule

droits (350 et 480 Cpm) sont statistiquement significatifs. C'est-à-dire que la quantité de ^{3}HTdr incorporée dans l'ADN par les gonades de 5 2/3 jours est une caractéristique du sexe.

A 6 1/2 et 7 1/3 jours seul l'écart entre l'ovaire et le testicule droits est significatif car la quantité de ^{3}HTdr incorporée dans l'ovaire et le testicule gauches augmente parallèlement avant de différer à nouveau à 8 jours de façon évidente.

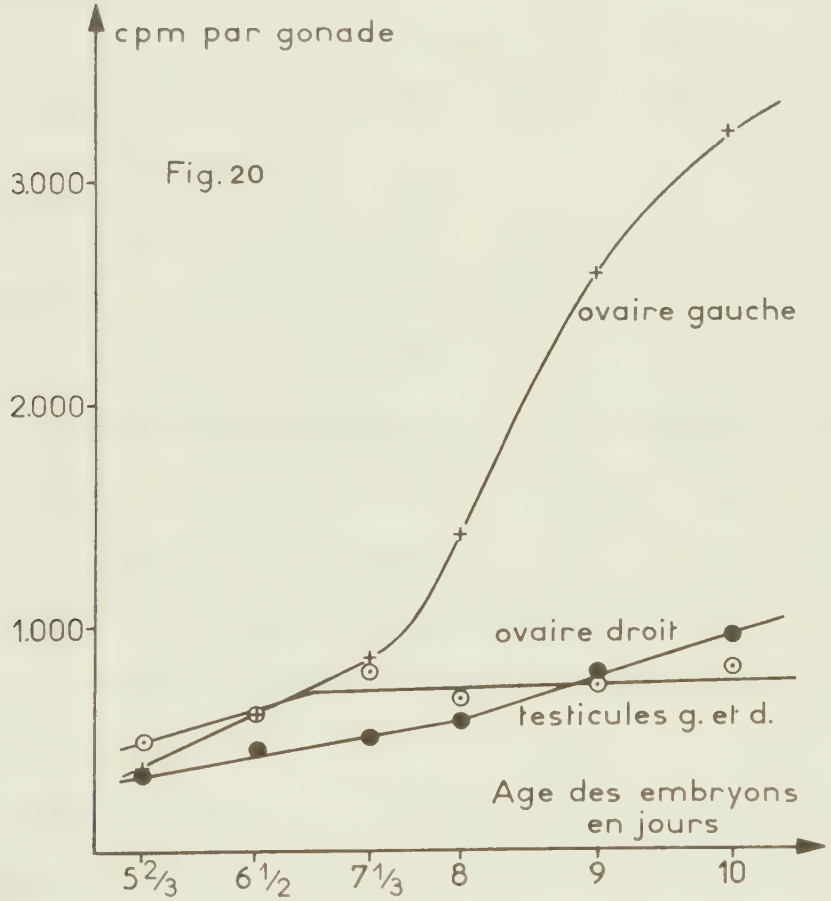


Figure n° 20 : Gonades de Poulet. ^{3}HTdr incorporée dans l'ADN d'une gonade.

La figure n° 20 montre que les gonades se distinguent bien par le tracé de la courbe d'augmentation de l'incorporation ; courbe sigmoïde et très ascendante pour l'ovaire gauche, courbe rectiligne à pente faible pour l'ovaire droit, et segment ascendant suivi d'une droite horizontale pour les testicules. On voit aussi que l'égalité de l'incorporation dans l'ovaire gauche et le testicule gauche à 6 1/2 et à 7 1/3 jours est fortuite et momentanée.

Chaque type de gonade se caractérise dès 5 2/3 jours par l'incorporation de ^{3}HTdr dans l'ADN, et ce caractère s'affirme progressivement entre 5 2/3 et 10 jours.

2. Incorporation de ^{3}HTdr rapportée à la quantité de protéines.

Si l'incorporation de ^{3}HTdr est rapportée non plus à une gonade comme nous venons de le voir mais à la quantité de protéines contenue dans cette gonade, les résultats, qui s'expriment alors en taux d'incorporation, sont différents des précédents. Les valeurs des taux d'incorporation par quantité de protéines sont données dans le tableau n° 18. Le numérateur (les Cpm) et le dénominateur (la quantité de protéines) des rapports exprimés par ces valeurs, ont été mesurés sur les mêmes lots de gonades.

Les taux d'incorporation diminuent dans les deux sexes entre 5 2/3 et 10 jours, plus dans les gonades droites que dans les gauches. En effet, à 5 2/3 jours et à 6 1/2 jours les taux sont plus élevés à droite qu'à gauche, chez le mâle et chez la femelle. Mais à partir de 7 1/3 jours le taux est plus élevé à gauche qu'à droite. La première partie de la période étudiée se caractérise donc par une chute brutale du taux d'incorporation de ^{3}HTdr dans la gonade droite, et moins forte

dans la gonade gauche. On peut remarquer aussi une particularité limitée à 5 2/3 jours : le taux d'incorporation est plus élevé dans le testicule gauche (67, 1 Cpm/microgr.) que dans l'ovaire gauche (61,9 Cpm/microgr.) et dans le testicule droit (84,0 Cpm/microgr.) que dans l'ovaire droit (80,4 Cpm/microgr.).

Age en jours	♀ Gauche	♀ Droite	♂ Gauche	♂ Droite
5 2/3	61,9	80,4	67,1	84,0
6 1/2	54,8	64,4	51,6	49,6
7 1/3	41,5	34,4	38,8	36,1
8	36,9	25,3	23,2	21,4
9	31,8	26,8	19,4	18,1
10	22,9	19,4	15,8	14,4

TABLEAU n° 18 : Gonades de Poulet. Incorporation de ^{3}HTdr dans l'ADN, rapportée à la quantité de protéines contenue dans les gonades (rapport des moyennes), en Cpm/microgr. de protéines.

Le test d'homogénéité effectué sur les 4 séries de mesures à 5 2/3 jours montrent qu'il est improbable ($p<0,01$) qu'elles proviennent d'une seule population. Les gonades de l'embryon de Poulet de 5 2/3 jours se distinguent donc les unes des autres suivant leur sexe et leur latéralité, par leur taux d'incorporation de ^{3}HTdr rapportée aux protéines.

A partir de 6 1/2 jours l'écart entre les taux des deux testicules est faible, mais toujours en faveur du gauche. L'écart entre les ovaires est toujours plus grand, et il s'inverse plus tard (à 7 1/3 jours) que pour les testicules.

Nous ne donnons pas de représentation graphique simple de l'évolution du taux d'incorporation en fonction de l'âge des embryons. Dans le paragraphe sur l'interprétation et la discussion des résultats nous les illustrerons par une figure plus élaborée dont la signification sera examinée en termes de croissance.

3. Incorporation de ^{3}HTdr rapportée à la quantité d'ADN.

Les quantités d'ADN utilisées pour le calcul de ces taux ont été estimées comme il a été expliqué précédemment. Les taux d'incorporation rapportée à ces quantités, donnés dans le tableau n° 19, n'ont donc pas la même précision que ceux du paragraphe précédent où l'incorporation et les quantités de protéines ont été mesurées sur les mêmes lots de gonades. Pour cette raison nous ne donnons qu'une seule valeur moyenne pour les deux testicules.

Le taux d'incorporation rapportée à la quantité d'ADN diminue entre 5 2/3 et 10 jours dans les 4 gonades, sauf dans l'ovaire gauche entre 5 2/3 et 6 1/2 jours où le taux augmente d'un tiers. La diminution est très rapide pour les testicules de 5 2/3 à 8 jours. Dans l'ovaire droit la chute brutale du taux d'incorporation est limitée à l'intervalle de 6 1/2 à 8 jours. Dans l'ovaire gauche elle se produit seulement entre 6 1/2 jours et 7 1/3 jours et elle est moins importante que dans les autres gonades. La décroissance du taux d'incorporation pendant la période étudiée est donc générale, mais elle présente dès le commencement une évolution propre à chaque gonade.

Age en jours	♀ Gauche	♀ Droite	♂ Gauche et droite
5 2/3	2.050	4.250	5.100
6 1/2	2.700	4.000	3.450
7 1/3	1.530	1.950	1.570
8	1.100	920	705
9	1.050	910	630
10	690	840	600

TABLEAU n°19 : Gonades de Poulet. Taux d'incorporation de ^{3}HTdr dans l'ADN, rapportée à la quantité d'ADN contenue dans les gonades ; en Cpm/microgr. d'ADN.

La valeur du taux d'incorporation diffère aussi d'une gonade à l'autre au même âge. A 5 2/3 jours le taux est très élevé dans les testicules, plus faible dans l'ovaire droit et beaucoup plus faible dans l'ovaire gauche. A 6 1/2 jours, c'est l'ovaire droit qui a le taux le plus élevé, et l'ovaire gauche le plus faible. A 8 et 9 jours le taux de l'ovaire gauche l'emporte sur celui des autres gonades. Aucun calcul statistique n'est possible sur ces taux puisqu'ils ont été calculés à partir d'estimations et non de mesures de quantités d'ADN.

On voit sur le tableau n°19 que l'ovaire gauche a, pendant une partie de cette période, le taux d'incorporation le plus faible malgré une croissance qui apparaît globalement très importante entre

6 et 10 jours (voir la IIème partie de ce travail). Cette situation sera discutée plus loin en détails, mais on peut dès maintenant voir que les vitesses de décroissance des taux sont probablement un élément d'explication de ce résultat étonnant.

Nous constatons donc des différences notables entre les valeurs des taux d'incorporation rapportée à l'ADN, dans les gonades du même âge. Chaque type de gonade se caractérise nettement par son taux de synthèse à 5 2/3 jours et par son évolution au cours du développement.

B. INTERPRETATION ET DISCUSSION DES RESULTATS

Afin de pouvoir interpréter nos résultats en termes de croissance nous devons accepter l'équivalence entre la quantité de ^{3}HTdr incorporée dans l'ADN et la quantité d'ADN synthétisée. Nous avons déjà expliqué les réserves que l'on devait faire à ce sujet et leurs conséquences pour la valeur de notre interprétation. Nous ne reviendrons pas sur cette question que nous supposons résolue dans la suite de ce paragraphe.

Dans ces conditions, la figure n° 20 montre que la quantité d'ADN synthétisée dans une gonade en 4 heures de culture augmente beaucoup plus vite dans l'ovaire gauche que dans les autres gonades pendant toute cette période. Cette croissance rapide de l'ovaire gauche commence dès l'intervalle 5 2/3 à 6 1/2 jours, et ainsi, dès 6 1/2 jours cette gonade synthétise autant d'ADN que les testicules et plus que l'ovaire droit. La quantité d'ADN synthétisée par unité de temps dans une gonade s'accroît donc plus dans l'ovaire gauche que dans les autres gonades entre 5 2/3 et 10 jours. C'est un signe de forte croissance qui se traduit morphologiquement par l'augmentation en volume.

On peut aussi exprimer la croissance par les taux de synthèse d'ADN. Ceux-ci, rapportés à la quantité de protéines ou d'ADN sont donnés dans les tableaux n°18 et 19. Nous ne reviendrons pas sur les différences significatives entre ces taux au début de cette période, car elles ont déjà été exposées. Elles restent entièrement valables si on remplace les taux d'incorporation par les taux de synthèse qui sont donc des caractères propres à chaque type de gonade à cet âge. Nous retiendrons seulement un aspect particulier de ces résultats pour tenter de l'expliquer : la supériorité des taux de synthèse dans les testicules par rapport aux ovaires, et de la gonade droite par rapport à la gauche au commencement de cette période. Cette situation se concilie mal, au premier abord, avec la forte croissance de l'ovaire gauche (voir IIème partie).

On peut trouver plusieurs explications complémentaires à cette "incohérence", et notamment le signe d'une mauvaise équivalence quantitative entre incorporation de ^{3}HTdr et synthèse d'ADN. Nous allons montrer que, sans pouvoir exclure une telle éventualité, ce phénomène s'explique d'une autre façon.

Pour cela nous avons recours à une représentation graphique inhabituelle, mais propre à mettre en évidence dans notre cas des différences peu sensibles sur les courbes et les tableaux de chiffres.

Nous représentons la variation des taux de synthèse d'ADN non pas en fonction de l'âge des embryons mais de la quantité de protéines ou d'ADN contenue dans les gonades. Nous savons par ailleurs que ces quantités sont elles mêmes des fonctions du temps (voir IIème partie). On suit donc l'évolution du taux de synthèse par rapport à une donnée interne à l'organe étudié et qui lui est propre à un instant donné. Afin de rapprocher le plus possible les courbes des différents types de gonades, et particulièrement leur point d'origine,

les valeurs des taux de synthèse (en ordonnées) et celles des quantités de protéines ou d'ADN (en abscisses) sont exprimées en pourcentages de la valeur du taux à 5 2/3 jours.

Ainsi, toutes les courbes ont la même origine à 100 % en abscisses et en ordonnées, puis divergent ou se superposent. L'intérêt principal d'un tel mode de représentation est la facilité de comparaison de la pente des courbes ainsi obtenues.

Cette pente représente la variation du taux de synthèse en fonction de la croissance globale de chaque gonade en protéines ou en ADN. Une pente positive indique une augmentation de taux de synthèse, et une pente négative une diminution du taux de synthèse, d'autant plus rapide que la pente est plus forte. La figure n°21 représente l'évolution, dans les coordonnées décrites ci-dessus, du taux de synthèse de l'ADN rapportée à la quantité de protéines.

Dès le commencement, entre 5 2/3 et 6 1/2 jours, la pente décroissante de l'ovaire gauche est plus faible que celle des trois autres gonades, qui sont sensiblement égales. C'est seulement lorsque la quantité de protéines a beaucoup augmenté dans les gonades que les pentes deviennent voisines. La décroissance du taux de synthèse de l'ovaire gauche est donc nettement plus lente que celle des autres gonades. Le mode de représentation choisi montre bien qu'une différence acquise au commencement reste sensible, et continue d'avoir des effets sur la croissance pendant toute la période examinée, même si elle ne se maintient pas jusqu'à la fin. C'est à dire qu'un taux de synthèse peu élevé qui diminue lentement assure une croissance plus rapide qu'un taux de synthèse élevé mais en très forte diminution d'un stade à l'autre. On peut remarquer en outre, que la disposition respective des courbes de la figure n° 21 illustre bien la dissymétrie morphologique des gonades observée pendant cette période.

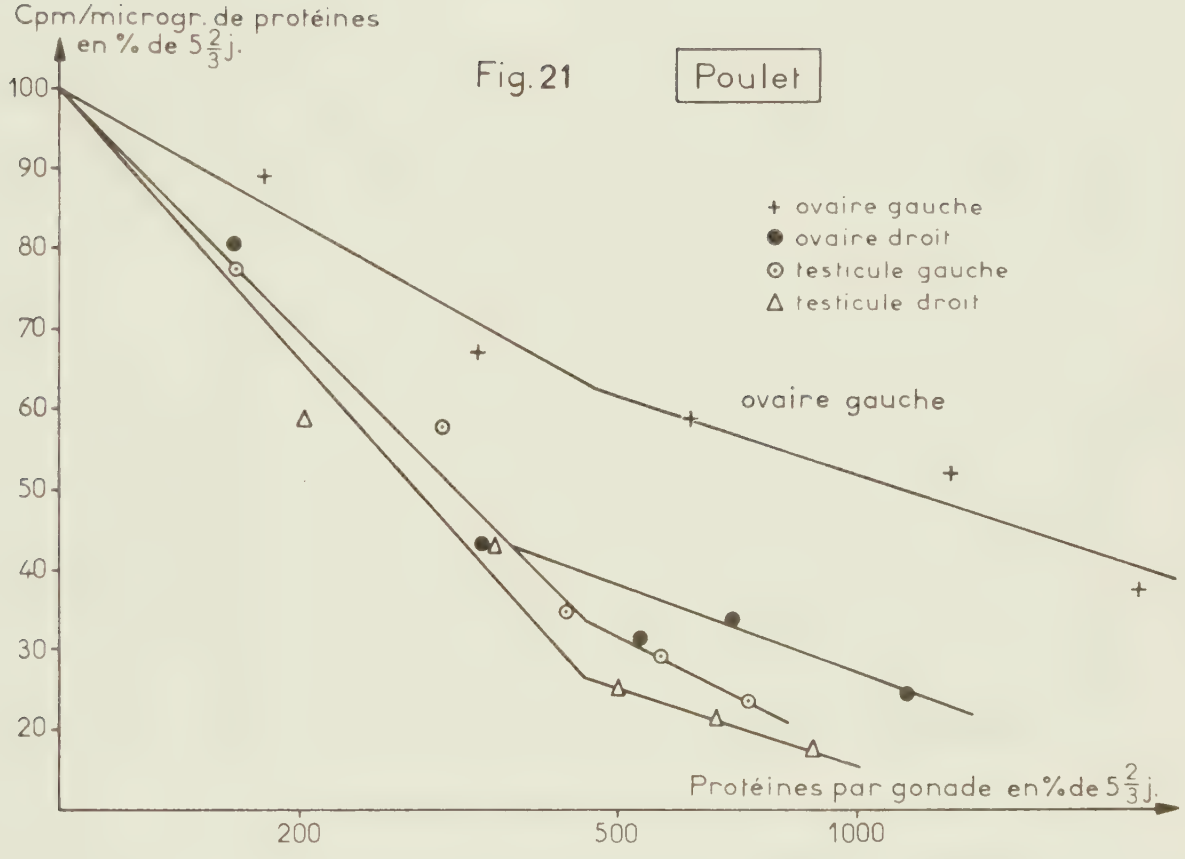


Figure n° 21 : Gonades de Poulet. Taux de synthèse d'ADN rapportée aux protéines, en fonction de la quantité de protéines par gonade. Valeurs exprimées en pourcentages de la moyenne à 5 2/3 jours (voir texte).

Lorsque la synthèse de l'ADN est rapportée à la quantité d'ADN contenue dans les gonades, les courbes obtenues sont moins simples à décrire (figure n° 22). Il est possible que cette difficulté provienne de l'origine distincte des deux termes du rapport

du taux de synthèse : la radioactivité incorporée et la quantité d'ADN.

Au commencement le taux augmente brusquement dans l'ovaire gauche, puis il décroit assez régulièrement jusqu'à la fin de cette période. Le taux de synthèse de l'ADN dans l'ovaire droit et les testicules évolue de façon assez analogue : il diminue constamment du début à la fin de cette période, dans l'ensemble plus vite que celui de l'ovaire gauche, sauf vers la fin.

La différence considérable observée dans l'évolution des taux de synthèse, appliquée à des quantités d'ADN déjà très inégales, permet d'expliquer la croissance rapide de l'ovaire gauche malgré un taux de synthèse relativement bas à 5 2/3 jours.

D'après ces résultats nous pouvons conclure que, dès le début de cette période, lorsque peu ou pas de signes distinctifs sont décelables entre les gonades, la synthèse de l'ADN est déjà caractéristique du sexe. Que cette synthèse soit exprimée en valeur absolue par gonade, ou en taux, elle diffère selon le sexe et la latéralité dès 5 2/3 jours. Ces différences annoncent celles qui seront évidentes 24 ou 48 heures après et préparent la forte croissance de l'ovaire gauche, signe spécifique de sa différenciation.

II - SYNTHESE D'ADN DANS LES GONADES DE CANARD.

Les gonades embryonnaires de Canard de 7 à 11 jours sont cultivées "in vitro" en présence de ^{3}HTdr. Le sexe des embryons est identifié à 7 et 8 jours pas le caryotype et de 9 à 11 jours par la morphologie des gonades. Dans l'intervalle de 7 à 11 jours apparaissent les signes morphologiques, physiologiques et histologiques de

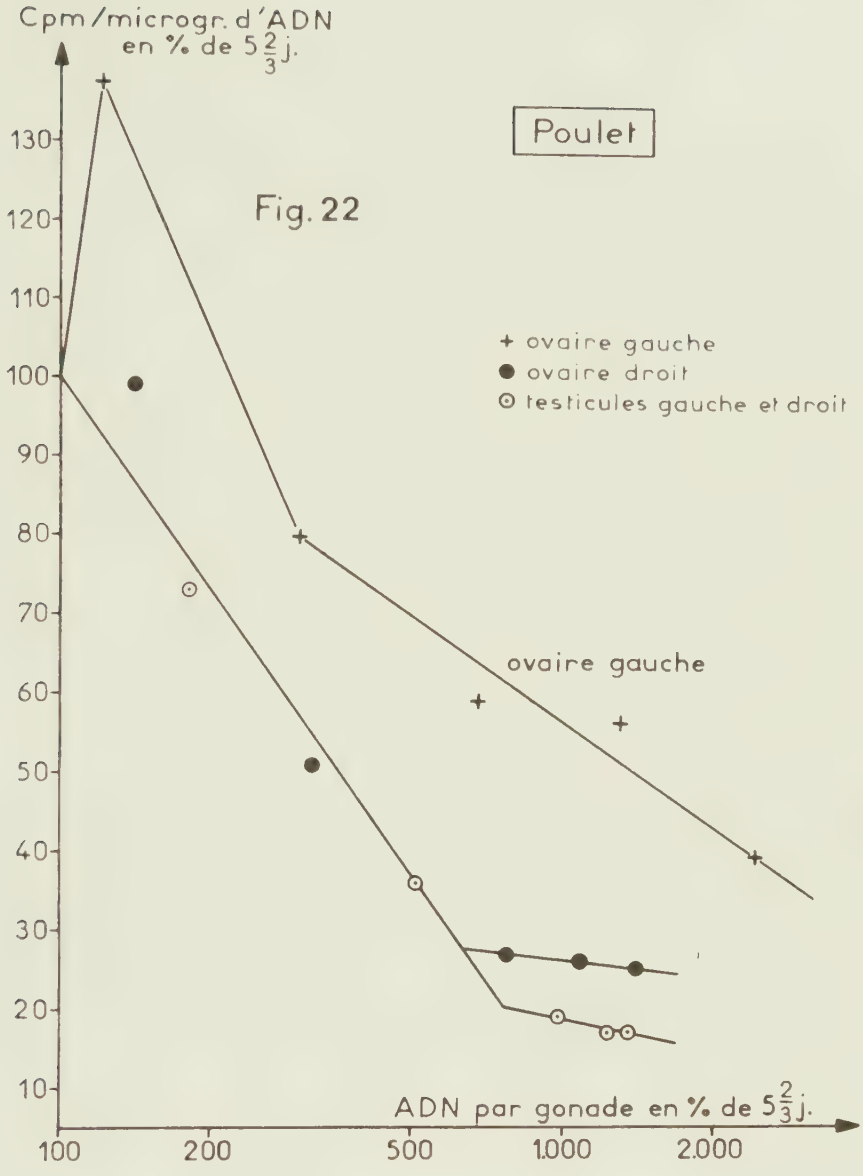


Figure n° 22 : Gonades de Poulet. Taux de synthèse d'ADN rapportée à l'ADN, en fonction de la quantité d'ADN par gonade. Valeurs exprimées en pourcentages de la moyenne à 5 2/3 jours. (voir texte).

la différenciation sexuelle des gonades. La période étudiée est donc la même que pour le Poulet.

A. - RESULTATS.

1. Mesure de ^{3}HTdr incorporée dans les gonades.

Les moyennes des mesures de radioactivité incorporée dans l'ADN des gonades sont données dans le tableau n° 20. A tous les stades la gonade gauche, ovaire ou testicule, incorpore plus que la droite, mais cette différence est plus grande chez la femelle que chez le mâle dès 7 jours et elle ne cesse de s'accroître ensuite chez la femelle. A 7 jours les écarts entre les deux gonades d'un même sexe ne sont pas statistiquement significatifs, mais les différences entre ovaires et testicules le sont ($p<0,01$) et le restent à 8 jours. Entre 7 et 9 jours l'incorporation de ^{3}HTdr augmente de 300 Cpm par jour

Age en jours				
	Gauche	Droite	Gauche	Droite
7	490	430	640	610
8	690	550	890	860
9	1.150	640	1.270	1.200
10	1.640	730	1.270	1.100
11	1.720	730	1.250	1.190

TABLEAU n° 20 : Gonades de Canard. Incorporation de ^{3}HTdr dans l'ADN, en Cpm par gonade.

dans les testicules. L'augmentation est seulement de 100 Cpm chaque jour dans l'ovaire droit entre 7 et 10 jours. Ensuite elle reste constante dans les testicules et dans l'ovaire droit. Au contraire la quantité de ^{3}HTdr incorporée ne cesse d'augmenter de manière accélérée entre 7 et 10 jours dans l'ovaire gauche. L'incorporation de ^{3}HTdr dans l'ADN est donc caractéristique du sexe pendant toute cette période, et dès 7 jours des différences sont décelables entre les ovaires et les testicules.

Ces différences sont illustrées par les courbes de la figure n° 23, tracées à partir des valeurs du tableau n° 20. Pour simplifier la figure, une seule courbe moyenne a été tracée pour les deux testicules.

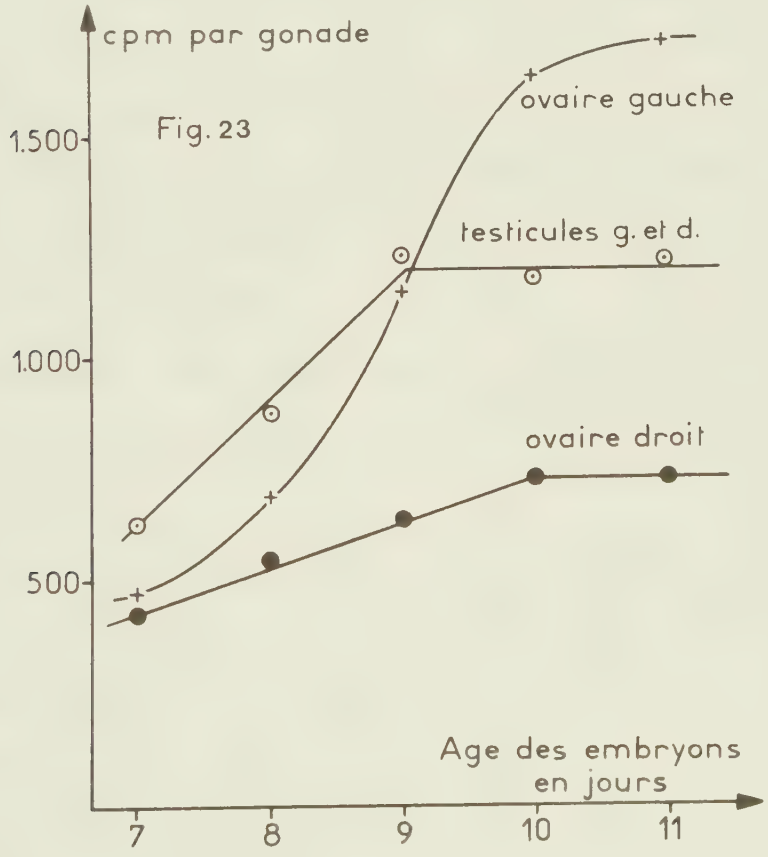


Figure n° 23 : Gonades de Canard. ^{3}HTdr incorporée dans l'ADN d'une gonade.

Les courbes de l'ovaire droit et des testicules sont d'abord rectilignes et ascendantes puis horizontales, tandis que celle de l'ovaire gauche est de forme sigmoide, c'est à dire exponentielle accélérée puis ralentie.

Ces courbes présentent une grande similitude avec celles que nous avons obtenues pour le Poulet (figure n° 20). On peut remarquer cependant que le niveau de stabilisation de la courbe des testicules est, relativement à l'ovaire droit, beaucoup plus haut chez le Canard que chez le Poulet. A cause de cela l'incorporation dans l'ovaire gauche est supérieure à celle des testicules dès le 8ème jour chez le Poulet, et seulement pendant le 10ème jour chez le Canard.

2. Incorporation de ^{3}H.Tdr rapportée à la quantité de protéines.

Le taux d'incorporation rapportée à la quantité de protéines a été calculé d'après les valeurs moyennes des tableaux n° 20 pour la radioactivité et n° 9 pour les quantités de protéines. Cependant les valeurs à 7 jours de ce tableau ont été modifiées car une des mesures de protéines ne correspondait pas à une mesure de radioactivité incorporée. Pour conserver la corresponcance complète entre les deux termes du rapport $\frac{^{3}\text{HTdr incorporée}}{\text{quantité de protéines}}$ nous avons recalculé les moyennes des quantités de protéines à 7 jours sans tenir compte de cette valeur isolée.

Les valeurs moyennes des taux d'incorporation de ^{3}HTdr par rapport à la quantité de protéines sont données dans le tableau n° 21. Dans les quatre types de gonades le taux d'incorporation diminue entre 7 et 10 jours. Cette diminution est assez lente et limitée dans l'ovaire gauche, tandis qu'elle est très rapide dans les testicules, et plus particulièrement dans le droit. C'est ainsi que l'ovaire gauche qui a le taux le plus faible des 4 gonades à 7 jours, a le taux

le plus élevé à partir de 9 jours. Au contraire, le testicule droit qui a le taux le plus élevé à 7 jours a un taux très bas à 11 jours. Les écarts entre les valeurs des taux des 4 gonades de 7 jours ne sont pas significatifs. On peut cependant remarquer l'analogie de ces résultats avec ceux que nous avons obtenus chez le Poulet, où l'analyse statistique confirmait l'existence des différences mesurées entre ovaires et testicules. Nous pensons que l'insuffisance du nombre de mesures par rapport à la dispersion de celles-ci est à l'origine de ce résultat négatif du calcul statistique et non pas l'absence de différences effectives.

Les résultats donnés par le tableau n° 21 pour le Canard ont une grande similitude avec ceux du Poulet (tableau n° 18) si on tient compte d'un décalage d'une journée entre les deux espèces. Les valeurs des taux ne sont pas égales mais l'évolution chronologique de ceux-ci est assez voisine chez le Poulet et le Canard : même valeur relative des taux les uns par rapport aux autres au début de cette période, et décroissance plus lente dans l'ovaire gauche que dans les autres gonades.

Age en jours	♀ Gauche	♀ Droite	♂ Gauche	♂ Droite
7	52,5	61,0	58,8	68,7
8	39,4	40,0	42,7	46,8
9	39,4	31,9	35,8	36,0
10	31,9	24,7	22,3	21,3
11	23,7	19,9	17,9	18,3

TABLEAU n° 21 : Gonades de Canard. Incorporation de ^{3}HTdr dans l'ADN, rapportée à la quantité de protéines contenues dans les gonades (rapport des moyennes), en Cpm par microgr. de protéines.

Malgré l'absence de preuve statistique nous concluons à l'existence de différences précoces entre les taux d'incorporation de ^{3}HTdr rapportée à la quantité de protéines des 4 types de gonades.

3. Incorporation de ^{3}HTdr rapportée à la quantité d'ADN.

Les quantités d'ADN contenu dans les gonades et de ^{3}HTdr incorporée, sont mesurées sur les mêmes lots d'organes. Les deux termes du rapport exprimant le taux correspondent donc exactement l'un à l'autre. Les quantités d'ADN sont celles du tableau n° 11, sauf pour 7 jours où une valeur d'ADN sans mesure d'incorporation a été retirée et la valeur de la moyenne recalculée. Les quantités de ^{3}HTdr incorporée sont celles du tableau n° 20.

Les valeurs des taux d'incorporation rapportée à l'ADN sont données dans le tableau n° 22. Les taux diminuent dans les 4 gonades entre 7 et 11 jours. Cette baisse est beaucoup plus prononcée pour l'ovaire droit et les testicules que pour l'ovaire gauche. Dans celui-ci, la stabilité du taux entre 7 et 8 jours est à rapprocher de ce que l'on observe chez le Poulet pendant la période correspondante, où le taux d'incorporation augmente dans l'ovaire gauche et baisse dans les autres gonades (tableau n° 19). Un phénomène analogue se produit donc dans les 2 espèces au début de cette période : le taux d'incorporation rapportée à l'ADN diminue peu (Canard) ou augmente (Poulet) dans l'ovaire gauche tandis qu'il diminue brutalement dans l'ovaire droit et les testicules. C'est un aspect très caractéristique de l'évolution des taux d'incorporation dans les différents types de gonades.

A 7 jours le taux d'incorporation est plus élevé dans l'ovaire droit (4.110 Cpm/µg) que dans le gauche (2.180 Cpm/µg) et dans les testicules dont les taux sont égaux (3.200 Cpm/µg). Nous ne pouvons pas montrer la significativité statistique de ces différences car le nombre de mesures d'ADN est insuffisant (voir la IIème partie de ce

travail). Cependant, l'importance des écarts nous permet de dire que chaque gonade se caractérise bien, à ce stade, par son taux d'incorporation rapportée à l'ADN.

Age en jours	♀ Gauche	♀ Droite	♂ Gauche	♂ Droite
7	2.180	4.110	3.290	3.180
8	2.010	2.490	1.750	1.880
9	1.550	1.320	1.105	1.285
10	845	696	529	505
11	515	553	430	455

TABLEAU n° 22 : Gonades de Canard. Taux d'incorporation de ^{3}H Tdr dans l'ADN, rapportée à la quantité d'ADN contenue dans les gonades, en Cpm par microgr. d'ADN.

On peut aussi noter un détail déjà observé chez le Poulet (tableau n°19) : à 11 jours chez le Canard (10 jours chez le Poulet) le taux d'incorporation de l'ovaire droit redevient supérieur à celui de l'ovaire gauche. On ne peut trouver d'explication simple à ce fait, mais la similitude de l'observation dans les deux espèces doit être remarquée.

Nous retrouvons donc chez le Canard des résultats peu différents de ceux que nous avons obtenus avec le Poulet. Pour le Canard le calcul du taux d'incorporation de ^{3}HTdr rapportée à la quantité d'ADN a été fait directement à partir de mesures, et les résultats obtenus démontrent le lien entre le sexe des gonades et leur taux d'incorporation pendant cette période. Les différences mesurées sont

sensibles soit en comparant les valeurs du taux dans les 4 types de gonades à un même âge, soit en comparant l'évolution de ces taux au cours de cette période de différenciation sexuelle. Le même résultat, obtenu indirectement chez le Poulet à partir d'estimations des quantités d'ADN, se trouve ainsi confirmé.

B. INTERPRETATION ET DISCUSSION DES RESULTATS.

Les différences numériques liées au sexe que nous venons de montrer dans l'incorporation de ^{3}HTdr peuvent être interprétées comme des différences dans la synthèse de l'ADN (voir plus haut).

La synthèse d'ADN dans les testicules de Canard de 7 jours est donc supérieure à celle des ovaires (tableau n° 20). Au même âge le taux de synthèse d'ADN rapportée à la quantité de protéines est plus élevé dans les testicules que dans les ovaires (tableau n° 21). Mais, avec ce taux de synthèse apparaît un élément nouveau : la supériorité de la gonade droite par rapport à la gauche, chez le mâle et chez la femelle. La situation est donc surprenante puisque l'ovaire gauche. qui,à 7 jours, a le taux de synthèse le plus faible des 4 gonades aura dans tous les jours suivants la croissance la plus forte. De même, si le taux de synthèse est calculé par rapport à la quantité d'ADN (tableau n° 22) la valeur la plus faible à 7 jours est aussi celle de l'ovaire gauche.

Cette situation se comprend mieux si nous avons recours à une représentation adéquate, comme nous l'avons déjà fait pour le Poulet. Il s'agit de représenter la décroissance du taux de synthèse d'ADN (exprimé en pourcentage de sa valeur à 7 jours) en fonction de la quantité de protéines ou d'ADN contenue dans les gonades (exprimée aussi en pourcentage de sa valeur à 7 jours). Les courbes de la figure n° 24 montrent, dans ces coordonnées, que le taux de synthèse d'ADN rapportée à la quantité de protéines décroit moins vite dans l'ovaire gauche que dans le droit au début de cette période. Au contraire, les

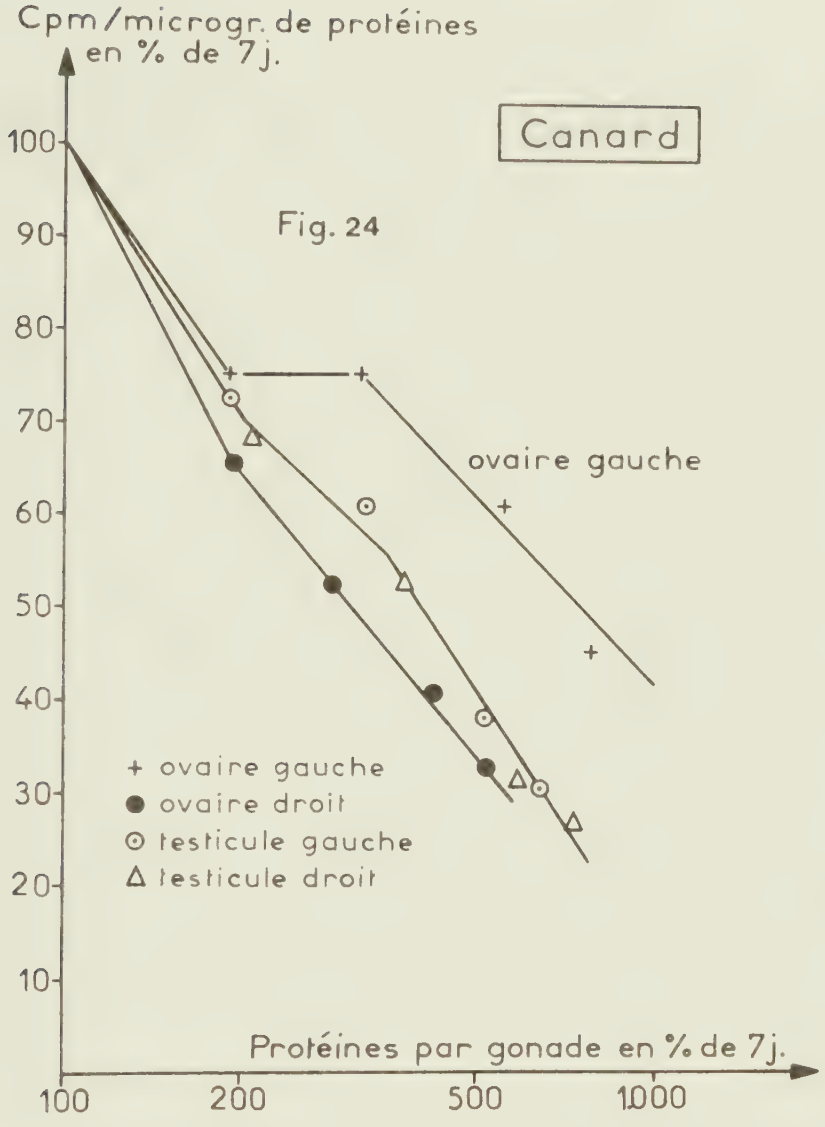


Figure n° 24 : Gonades de Canard. Taux de synthèse d'ADN rapportée aux protéines, en fonction de la quantité de protéines par gonade. Valeurs exprimées en pourcentages de la moyenne à 7 jours (voir texte).

pentes des courbes des deux testicules sont égales entre elles, et elles sont légèrement plus fortes que celles de l'ovaire gauche. Ensuite la pente devient très faible pour l'ovaire gauche, tandis qu'elle reste assez forte pour les testicules et plus forte encore pour l'ovaire

droit. Enfin, les pentes se rapprochent, mais la courbe de l'ovaire gauche reste complètement distincte des autres à cause de son tracé antérieur. Ces courbes illustrent bien la baisse du taux de synthèse de l'ADN rapportée à la quantité de protéines dans les différentes gonades : baisse nettement plus prononcée dans l'ovaire droit et les testicules que dans l'ovaire gauche.

De même, pour le taux de synthèse rapportée à la quantité d'ADN on voit (figure n° 25) que l'ovaire gauche se distingue des autres gonades au début de cette période par une pente très faiblement négative, tandis qu'elle est fortement négative pour les autres gonades. Ensuite, les pentes sont presqu'égales mais la courbe de l'ovaire gauche reste nettement au dessus de celle des trois autres gonades.

Le mode de représentation que nous avons choisi montre bien comment une diminution modérée des taux de synthèse d'ADN, même limitée dans le temps, permet à l'ovaire gauche de se distinguer des autres gonades par sa croissance malgré la valeur faible de ces taux à l'origine. De plus, ces taux de synthèse s'appliquent à des gonades au contenu en ADN déjà très inégal : à 7 jours l'ovaire gauche et les testicules contiennent deux fois plus d'ADN que l'ovaire droit. L'ovaire gauche contient beaucoup d'ADN et il a un taux de synthèse qui diminue lentement entre 7 et 8 jours : sa croissance est très forte. Les testicules contiennent beaucoup d'ADN à 7 jours mais leur taux de synthèse diminue rapidement, leur assurant seulement une croissance ralentie et limitée. A cause de son faible contenu en ADN à 7 jours et de la baisse très rapide du taux de synthèse, la croissance de l'ovaire droit est beaucoup moins importante que celle des autres gonades.

Les différences morphologiques citées habituellement comme des signes de la différenciation sexuelle, telle que la dissymétrie des ovaires et la symétrie des testicules, sont la conséquence à

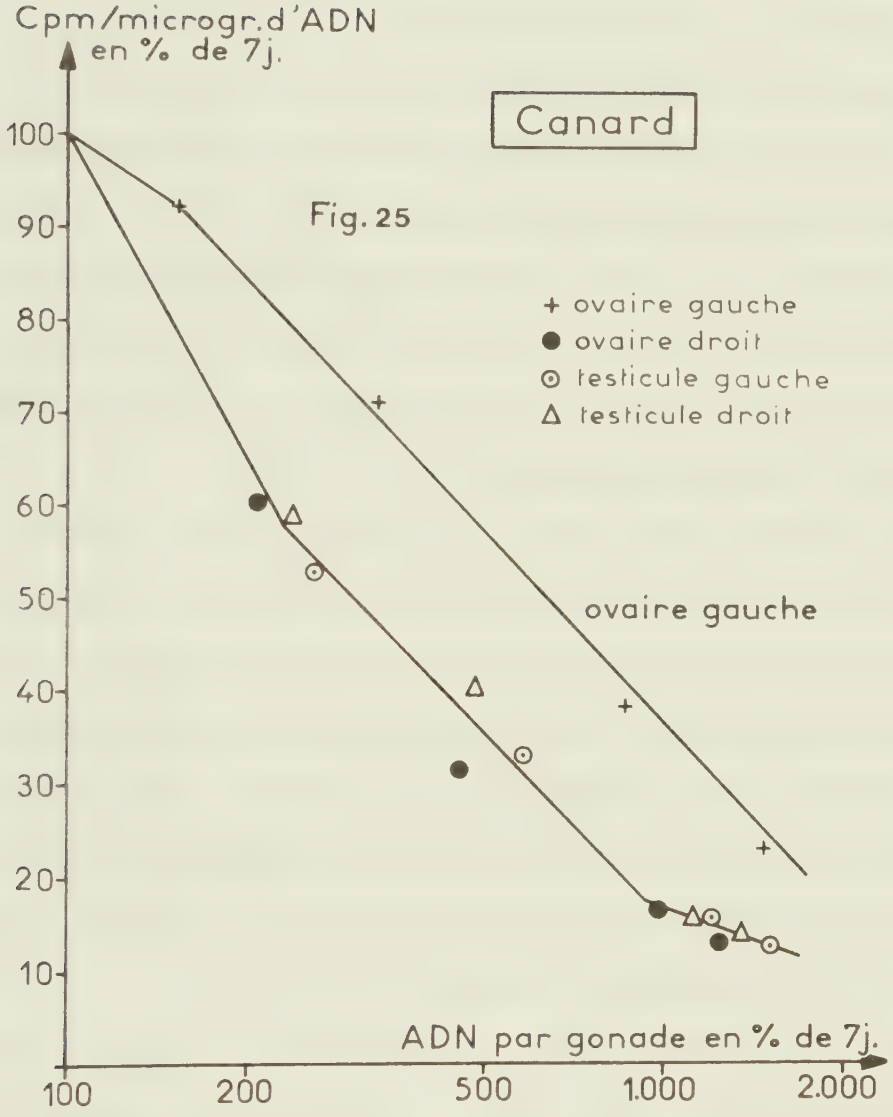


Figure n° 25 : Gonades de Canard. Taux de synthèse d'ADN rapportée à l'ADN, en fonction de la quantité d'ADN par gonade. Valeurs exprimées en pourcentages de la moyenne à 7 jours (voir texte).

l'échelle macroscopique des différences précoces dans les mécanismes de la croissance des gonades. Nous avons mis en évidence deux étapes par lesquelles

ces mécanismes différencient les gonades d'après leur sexe et leur latéralité : d'une part le contenu en ADN à 7 jours, d'autre part la variation du taux de synthèse de l'ADN après 7 jours.

III. CONCLUSION.

L'ensemble des résultats sur la synthèse de l'ADN dans les gonades de Poulet et de Canard apporte des éléments nouveaux pour la compréhension de la croissance au cours de la différenciation sexuelle.

Il apparaît clairement que la synthèse d'ADN est caractéristique de chaque type de gonade à 6 jours pour le Poulet et 7 jours pour le Canard. Dès ce stade les taux de synthèse présentent des différences qui dépendent du sexe des gonades.

Les résultats de nos mesures et leur illustration, donnée par les courbes de variation des taux de synthèse, démontrent l'existence d'une dissymétrie précoce de la croissance des gonades femelles que l'on peut opposer à la symétrie presque rigoureuse des deux testicules. La dissymétrie des ovaires d'oiseaux est donc préparée très tôt dans le développement de la gonade. Sa manifestation morphologique est la conséquence de la croissance,sexuellement différenciée, avant 6 jours pour le Poulet et 7 jours pour le Canard.

Nous avons montré (voir IIème partie) que le contenu en ADN des testicules au premier stade étudié est proche de celui de l'ovaire droit chez le Poulet et de celui de l'ovaire gauche chez le Canard. Nous venons de voir que le taux de synthèse de l'ADN rapporté à la quantité d'ADN est, pour les testicules, proche de celui de l'ovaire droit chez le Poulet de 5 2/3 jours et intermédiaire entre celui de l'ovaire droit et de l'ovaire gauche chez le Canard de 7 jours. Dans les deux espèces, les deux données de la croissance que nous avons

mesurées conduisent apparemment au même résultat : au premier stade étudié les testicules de Poulet ont une croissance analogue à l'ovaire droit et ceux de Canard analogue à l'ovaire gauche. Cependant, l'examen, par une représentation graphique appropriée, de l'évolution de ces mêmes résultats pendant la différenciation sexuelle montre que les testicules ont en réalité une croissance du même modèle que l'ovaire droit chez le Canard comme chez le Poulet. Les courbes décrivant la synthèse de l'ADN par gonade (figures 20 et 23) ou le taux de synthèse rapporté à la quantité d'ADN (figures 22 et 25) permettent de distinguer nettement la croissance de l'ovaire gauche de celle des trois autres types de gonades dès le premier intervalle de temps considéré (de 5 2/3 à 6 1/2 jours pour le Poulet et de 7 à 8 jours pour le Canard). Nous voyons là sur un exemple précis que le modèle de croissance d'un organe importe plus pour son développement que la valeur d'une donnée prise isolément. Les testicules du Canard, malgré la similitude momentanée de leur contenu en ADN ou de leur taux de synthèse avec celui de l'ovaire gauche, ont comme ceux du Poulet une croissance d'un modèle identique à celui de l'ovaire droit. Ce modèle de croissance de type linéaire est bien représenté par les courbes sur les figures n° 20 et 23. Ces figures montrent aussi le modèle de croissance exponentiel de l'ovaire gauche du Poulet et du Canard.

Le principal intérêt des différences que nous avons mesurées dans la synthèse de l'ADN, est de montrer que les mécanismes de la croissance des gonades sont sous la dépendance du sexe génétique de l'embryon. Cette dépendance se manifeste déjà à 5 2/3 jours chez le Poulet et à 7 jours chez le Canard.

Dans tout notre travail la gonade a été considérée comme un tissu homogène. Nous n'avons pas cherché à distinguer les types cellulaires qui la composent. Les techniques de mesures ne le permettaient

pas. Il est pourtant probable que le cortex, la médulla et les gonocytes n'ont pas une croissance identique. La mesure globale que nous avons faite est donc approximative et certaines anomalies des courbes peuvent venir de cette imprécision. Dans la dernière partie de ce travail nous examinerons comment mesurer le rôle respectif du cortex et de la médulla dans la croissance de la jeune gonade. Nous tenterons aussi de confronter ces résultats avec ceux de l'histologie pour mieux les situer dans le schéma habituel de la différenciation sexuelle.

QUATRIEME PARTIE

SYNTHESE D'ADN DANS LES GONADES DE L'EMBRYON DE POULET ENTRE $4\frac{1}{2}$ ET 6 JOURS.

INTRODUCTION

Dès 6 jours chez le Poulet et 7 jours chez le Canard les gonades embryonnaires se distinguent les unes des autres par leur synthèse d'ADN. La précocité de ce caractère témoigne du rôle important que joue la croissance pendant la différenciation sexuelle des gonades. Les deux composants histologiquement distincts de la gonade, l'épithélium germinatif (zone corticale) et la zone médullaire, contribuent chacun pour une part à cette croissance. Au moment où la gonade réalise une étape importante de son histogénèse, s'accroit considérablement et se différencie selon son sexe génétique, les mesures de synthèse d'ADN peuvent apporter des éléments nouveaux dans la compréhension et l'interprétation de ces phénomènes.

Nous avons donc entrepris de mesurer cette synthèse d'ADN avant 6 jours chez le Poulet par de nouvelles techniques car celles que nous avons utilisées précédemment ne sont pas applicables à de très jeunes gonades. En effet, avant 6 jours les gonades se réduisent à un fin cordon appliqué sur le mésonéphros dont elles se détachent difficilement et nous ne pouvons les

prélever entièrement, sans blessure. De plus, les quantités de materiel que l'on pourrait obtenir dans ces conditions seraient très inférieures aux seuils de sensibilité des techniques utilisées pour les dosages.

La culture in vitro des gonades en présence de précurseur radioactif, suivie du comptage de la radioactivité sur un broyat, a donc été remplacée par l'addition du précuseur in ovo, et par la mesure de la radioactivité sur coupes histologiques (voir les détails dans Materiel et Techniques).
Sur les coupes de gonades après autoradiographie on peut effectuer non seulement des mesures de radioactivité mais aussi des observations sur la localisation du marquage dans les différents tissus de la gonade. Ainsi, cette technique est suceptible de nous montrer des différences liées au sexe dans la synthèse d'ADN mais aussi de nous renseigner sur la prolifération cellulaire des tissus de la gonade pendant une phase décisive de son histogénèse. C'est vers ces deux aspects complémentaires de la croissance des gonades que nous avons orienté les recherches dont les résultats sont exposés dans cette partie de notre travail.

I - MESURE DE LA SYNTHESE D'ADN

Les mesures de radioactivité incorporée dans l'ADN effectuées sur des coupes histologiques ne sont pas de même nature que celles dont les résultats sont exposés dans la troisième partie. Chaque mesure est faite sur une surface de coupe de dimension arbitraire (5 à 10 cellules). Les coupes ont une épaisseur de 5 microns et la mesure porte donc sur la radioactivité contenue dans un petit volume aux dimensions

indéterminées. L'unité de radioactivité est aussi choisie arbitrairement puisque, pour chaque embryon, la valeur 100 est donnée à la surface la plus fortement marquée. Les mesures présentent donc les dimensions d'une intensité de marquage par unité de volume, c'est-à-dire d'un taux de marquage, mais elles ont un caractère doublement arbitraire. Les valeurs absolues de ces mesures ne sont donc comparables entre elles que pour un même embryon; par exemple celles de la gonade gauche et de la gonade droite. Pour comparer les mesures de deux ou plusieurs embryons il faut prendre les valeurs relatives qui éliminent tout caractère arbitraire. Ainsi, on ne peut comparer l'intensité du marquage de la gonade droite d'un embryon mâle et celle d'un embryon femelle, mais on peut comparer l'intensité relative du marquage de la gonade droite par rapport à la gonade gauche dans deux embryons de sexe différent. Il en est de même pour les embryons d'âge différent.

Le terme de marquage utilisé dans l'exposé de ces résultats désigne les grains d'argent produits dans l'émulsion photographique par la thymidine tritiée incorporée dans l'ADN. Il existe une certaine relation entre la mesure de la radioactivité incorporée, représentée ici par la marquage, l'incorporation de ^{3}H Tdr et la synthèse d'ADN. La discussion au sujet de cette équivalence présentée dans la troisième partie est valable pour la mesure de la radioactivité sur coupes. Dans l'exposé des résultats nous parlerons de marquage, c'est-à-dire de ^{3}H Tdr incorporée, puis dans l'interprétation nous prendrons ce marquage pour l'estimation rigoureuse de la synthèse d'ADN, de la prolifération cellulaire et de la croissance des gonades.

L'intensité du marquage a été mesurée sur les coupes de gonades embryonnaires de Poulet de 4 1/2 jours à 6 jours. Quelques mesures ont aussi été effectuées sur les gonades de Canard de 6 et 7 jours. Ces mesures ont été réalisées de deux façons différentes. D'une part le marquage a été mesuré indistinctement sur toute la surface des coupes choisies (une coupe sur 5 ou sur 10), d'autre part il a été mesuré séparément sur la zone corticale (Cx) et sur la zone médullaire (Md) des gonades. La délimitation exacte de ces deux zones n'est pas simple, car elles sont définies par des critères histologiques qui ne sont pas constants. Aussi nous avons utilisé une particularité du marquage de ces coupes pour délimiter ces deux zones : il existe entre elles, particulièrement à 5 et 6 jours, une zone intermédiaire qui se marque peu ou pas du tout. Cette zone, que nous avons appelée zone sous-corticale, a un grand intérêt dans l'histogenèse de la gonade comme nous le verrons dans l'interprétation de ces résultats. Il n'est pas possible d'attribuer, par les seuls moyens dont nous disposons, cette partie non marquée de la gonade à l'une ou l'autre zone (Cx ou Md). L'absence presque complète de marquage qui la distingue du reste de la gonade nous a semblé suffisante pour l'écarter de nos mesures. Celles-ci se limitent donc dans ce cas à la zone corticale qui borde le coelome et à la zone médullaire profonde qui présente toujours un marquage nucléaire. L'étendue de la zone sous-corticale est très variable d'une coupe à l'autre et surtout d'un stade de développement à l'autre. Nous avons considéré qu'elle se limitait à la zone de marquage faible ou nul située entre les zones corticale et médullaire. Les deux séries de mesures que nous avons effectuées, en partie sur les mêmes embryons, se distinguent donc l'une de l'autre par l'inclusion de la

zone sous-corticale dans les mesures portant sur toute la surface des coupes et par son exclusion des mesures portant séparément sur la zone corticale et la zone médullaire.

Le rôle de cette zone sous-corticale dans l'histogenèse de la gonade sera examiné plus loin, mais nous devons dès maintenant montrer qu'il ne s'agit pas d'un artéfact ou d'un défaut de la technique dû à l'éloignement des sources de précurseur. On voit souvent des cellules de la zone médullaire fortement marquées et situées au centre des coupes, plus loin du coelome ou de la veine sous-cardinale, que les cellules de la zone sous-corticale. D'autre part cette zone apparaît quelle que soit la dimension de la coupe et, par conséquent, l'éloignement du coelome et de la veine sous-cardinale qui apportent la ^{3}HTdr aux gonades. La partie centrale de la médullaire de 6 jours est bien marquée alors qu'une zone sous-corticale est visible en bordure de la zone sous-corticale des gonades de 4 1/2 et 5 jours (figures 26 à 28). On peut en conclure que la mauvaise répartition du précurseur radioactif n'est pas en cause dans ce phénomène.

RESULTATS .

Afin de donner une vue d'ensemble de nos résultats, nous présentons dans le tableau n° 23 les valeurs absolues de nos mesures de radioactivité pour chaque embryon étudié. Les valeurs relatives correspondantes qui sont utilisées pour l'étude de ces résultats sont données dans les tableaux n° 24 à 29.

A. - MESURE DU MARQUAGE EFFECTUEE SUR TOUTE LA SURFACE DES COUPES.

Gonades de Poulet.

Le tableau n° 24 donne les valeurs moyennes de l'intensité du marquage mesurée sur toute la surface des coupes, et exprimée par le rapport $\frac{\text{gonade droite}}{\text{gonade gauche}}$. Dans tous les cas étudiés à 5 et 6 jours

ge en jours	Stade de développement	Mesures sur toute la surface des coupes		Mesures sur zones corticale et médullaire séparées			
				Zone corticale (Cx)		Zone médullaire (Md)	
		Gonade gauche	Gonade droite	Gauche	Droite	Gauche	Droite
,5	26	--	--	25,2	19,6	21,3	27,9
	26	--	--	23,0	21,2	28,5	37,2
	26+	--	--	29,1	26,7	46,9	52,3
	27	26,9	28,7	--	--	--	--
♀	?	37,7	40,4	29,6	32,1	44,5	47,0
	?	31,0	43,6	21,3	22,1	32,4	38,3
	27+	33,6	45,1	--	--	--	--
	28	28,1	31,2	--	--	--	--
	28	28,4	41,8	21,2	25,6	33,3	44,9
	29	--	--	19,8	29,6	39,2	44,5
5	25	--	--	32,1	17,9	24,8	21,5
5	26 —	--	--	33,0	25,4	36,3	39,2
	26	--	--	23,8	24,4	35,0	38,5
	26	--	--	25,7	25,5	30,9	41,6
	27 —	41,7	50,2	--	--	--	--
	27	32,7	37,2	25,1	26,6	39,6	41,1
	27	--	--	30,5	27,2	35,6	40,1
♂	?	28,9	38,2	25,8	27,5	34,5	44,5
	?	29,8	42,5	24,3	36,5	41,8	45,0
	28+	25,0	29,9	20,9	19,5	31,4	30,5
	29-	25,9	29,9	--	--	--	--
	29-	--	--	18,4	29,5	25,6	39,6
	29	--	--	17,0	24,3	34,3	37,8
	29	--	--	19,5	27,6	37,0	43,4

TABLEAU n° 23 : Gonades de Poulet. Tableau récapitulatif de toutes les mesures d'intensité de marquage sur coupes histologiques. Voir explications dans le texte.

la valeur de ce rapport est supérieure à 1. Elle varie sensiblement d'un embryon à l'autre et ces écarts masquent, s'ils existent, ceux qui sont liés à l'âge ou au sexe des embryons. En effet il n'y a pas de différence numérique évidente entre 5 et 6 jours, ou entre les embryons mâles et les embryons femelles. Cependant, dans ce dernier cas,

la moyenne des 4 valeurs du rapport est plus élevée à 5 jours pour les mâles que pour les femelles (1,27 et 1,22 respectivement). La faiblesse de cette différence ne permet pas d'affirmer sa dépendance du sexe, mais un autre résultat apporte un argument en faveur de cette possibilité. Sur les 8 embryons de 5 jours (4 mâles et 4 femelles) nous avons mesuré l'indice de marquage, c'est-à-dire le rapport du nombre de noyaux marqués au nombre total de noyaux. D'après ces quelques mesures la moyenne des rapports de l'indice de la gonade droite à celui de la gonade gauche est de 1,16 pour les testicules et de 1,07 pour les ovaires. Le rapport des indices présente donc la même inégalité entre les sexes que le rapport de l'intensité du marquage des coupes, bien que dans l'un et l'autre cas la dispersion des valeurs soit assez grande et interdise toute conclusion définitive. Cependant ce résultat suggère l'existence de différences en relation avec le sexe, dès 5 jours. Nous pouvons noter que, à ce stade, la différence de marquage (intensité et indice) est plus grande entre les testicules qu'entre les ovaires. Seules des techniques plus précises que les notres et des mesures plus nombreuses permettraient de confirmer ces différences.

La valeur supérieure à 1 du rapport entre l'intensité du marquage de la gonade droite et de la gonade gauche traduit une incorporation de ^{3}HTdr plus forte à droite qu'à gauche. Pour les embryons de 6 j. ce résultat est équivalent à celui que nous avons présenté dans la 3è partie pour les taux de l'incorporation rapportée aux quantités de protéines (tableau n°18). Bien qu'aucune comparaison directe entre ces deux séries de résultats ne soit possible, en raison de leur nature différente, il est très probable qu'elles traduisent le même phénomène. Celui-ci est assez précoce puisqu'on peut l'observer dès le stade 27 (embryon de 5 jours).

Age en jours	Stade de dévelop.	OVAIRES	TESTICULES	Stade de dévelop.	Age en jours
5	27	1,07	1,20	27-	5
5	?	1,07	1,14	27	5
5	?	1,41	1,32	?	5
5	27+	1,34	1,43	?	5
	moyenne	1,22	1,27	moyenne	
6	28	1,11	1,20	28+	6
6	28	1,47	1,15	29-	6
	moyenne	1,29	1,18	moyenne	

TABLEAU n° 24 : Gonades de Poulet. Mesure de la radioactivité sur toute la surface des coupes : valeur de la gonade droite rapportée à celle de la gonade gauche.

Gonades de Canard.

Bien que cette partie de notre travail soit consacrée au Poulet, nous avons aussi effectué quelques mesures sur l'embryon de Canard dont nous donnons les résultats dans le tableau n° 25 pour montrer la similitude des phénomènes dans les deux espèces.

La valeur du rapport de l'intensité du marquage à droite et à gauche est supérieure à 1, et à peu près égale pour les 6 embryons étudiés, quel que soit leur âge et leur sexe. Cela traduit la supériorité de l'incorporation de ^{3}HTdr à droite comme cela a déjà été montré pour le taux d'incorporation rapportée aux protéines (tableau n° 21). Ce résultat complète celui que nous venons de présenter pour le Poulet au même stade de développement.

Age en jours	OVAIRES	TESTICULES	Age en jours
6	1,30	1,25	6
6	1,19	1,24	6
7	1,25	1,31	7

TABLEAU n° 25 : Gonades de Canard. Mesure de la radioactivité sur toute la surface des coupes : valeur de la gonade droite rapportée à celle de la gonade gauche.

B. MESURE DU MARQUAGE EFFECTUEE SEPAREMENT SUR LES ZONES CORTICALE ET MEDULLAIRE.

Comme dans le paragraphe précédent nous comparerons seulement les rapports des mesures de marquage dans deux tissus, deux gonades ou deux embryons différents. Nous examinerons l'évolution, entre 4 1/2 et 6 jours, des rapports d'intensité suivants :

$\frac{Cx\ D}{Cx\ G}$ c'est à dire $\frac{\text{zone cort. de la gonade droite}}{\text{zone cort. de la gonade gauche}}$,

$\frac{Md\ D}{Md\ G}$ c'est à dire $\frac{\text{zone médul. de la gonade droite}}{\text{zone médul. de la gonade gauche}}$, $\frac{Cx\ D}{Md\ D}$ et $\frac{Cx\ G}{Md\ G}$.

1 - $\frac{Cx\ D}{Cx\ G}$. Ce rapport exprime l'intensité relative du marquage dans la zone corticale de la gonade droite par rapport à la gonade gauche. La valeur de ce rapport augmente entre 4 1/2 et 6 jours (tableau n°26). A 4 1/2 jours le rapport est inférieur à 1, c'est à dire que le marquage est plus faible à droite qu'à gauche. A 5 jours il est égal à 1, le marquage est donc égal dans la zone corticale des deux gonades. A 6 jours le rapport est supérieur à 1, donc le marquage de la zone corticale droite est plus intense que celui de la gauche. Ces

Age en jours	Stade de dévelop.	OVAIRES	TESTICULES	Stade de dévelop.	Age en jours
			0,56	25	4,5
4,5	26-	0,78	0,77	26-	4,5
			0,67	moyenne	
5	26	0,92	1,03	26	5
5	26+	0,92	0,99	26	5
5	?	1,08	1,06	27	5
5	?	1,04	0,89	27	5
			1,07	?	5
			1,50	?	5
5	moyenne	0,99	1,09	moyenne	
6	28	1,21	0,93	28+	6
6	29	1,50	1,60	29-	6
			1,43	29	6
			1,42	29	6
6	moyenne	1,36	1,35	moyenne	

TABLEAU n° 26 : $\frac{Cx\ D}{Cx\ G}$

Zone corticale des gonades de Poulet : marquage de la gonade droite rapporté à celui de la gonade gauche.

observations ne montrent pas si l'incorporation de ^{3}HTdr augmente ou diminue pendant cette période dans la zone corticale, mais prouvent qu'elle augmente plus vite, ou diminue moins vite, à droite qu'à gauche. De ce résultat nous retiendrons particulièrement qu'il existe à 4 1/2

jours une étape du développement de la gonade pendant laquelle la zone corticale gauche incorpore plus de ^{3}HTdr que la droite. Il n'est pas possible de préciser s'il y a une différence entre les gonades mâles et femelles sur ce point. Les chiffres ne l'indiquent pas, mais le nombre de mesures est insuffisant pour affirmer qu'il n'y en a pas.

2 - $\frac{\text{Md D}}{\text{Md G}}$. Ce rapport exprime l'intensité du marquage de la zone médullaire droite par rapport à la gauche (tableau n° 27). Sur les 19 embryons de 4 1/2 à 6 jours que nous avons étudiés, la valeur de ce rapport est supérieure à 1 pour 17 d'entre eux. Un embryon de 6 jours (stade 28+) a un rapport de 0,97 qui représente probablement un cas limite de déviation autour de la moyenne, comme l'indiquent les valeurs des autres embryons d'âge comparable. Un embryon très jeune (stade 25) a un rapport $\frac{\text{Md D}}{\text{Md G}}$ dont la valeur est de 0,87. Il s'agit soit d'un cas particulier et anormal, soit d'un cas montrant un phénomène qui arrive à son terme vers 4 1/2 jours. Si cela est exact, la zone médullaire gauche se marque plus que la droite avant 4 1/2 jours. Cette supériorité de la gonade gauche sur la droite a déjà été observée pour la zone corticale dans les embryons de 4 1/2 jours (tableau n° 26). Cela signifie que pendant les premières étapes de l'histogenèse des gonades l'incorporation de ^{3}HTdr dans l'ADN est supérieure à gauche et que cette supériorité cesse plus tôt dans la zone médullaire que dans la zone corticale.Cette éventualité ne peut pas être écartée car elle s'accorde bien avec l'asymétrie morphologique des gonades observée dès 4 1/2 jours, mais elle ne peut être démontrée d'après nos seules observations.

Par contre, nos mesures montrent sans ambiguité la supériorité du marquage de la zone médullaire droite par rapport à la gauche à partir du stade 26-(4 1/2 jours). C'est la même situation que nous avons rencontrée précédemment pour la mesure du marquage à partir de 5 jours (tableau n°24) et pour le taux d'incorporation à partir de 6 jours (tableau n°18).

Age en jours	Stade de dévelop.	OVAIRES	TESTICULES	Stade de dévelop.	Age en jours
			0,87	25	4,5
4,5	26-	1,31	1,11	26-	4,5
5	26	1,31	1,10	26	5
5	26+	1,12	1,35	26	5
5	?	1,06	1,04	27	5
5	?	1,18	1,13	27	5
			1,29	?	5
			1,08	?	5
5	Moyenne	1,17	1,17	Moyenne	
6	28	1,35	0,97	28+	6
6	29	1,14	1,55	29-	6
			1,10	29	6
			1,17	29	6
6	Moyenne	1,25	1,20	Moyenne	

TABLEAU n° 27 : $\frac{\text{Md D}}{\text{Md G}}$

Zone médullaire des gonades de Poulet : marquage de la gonade droite rapporté à celui de la gonade gauche.

3- $\frac{\text{Cx D}}{\text{Md D}}$. Dans les paragraphes 1 et 2 nous avons examiné l'évolution du marquage des zones corticale et médullaire de la gonade droite par rapport à la gonade gauche. Nous comparerons maintenant dans les paragraphes 3 et 4 l'évolution du marquage de la zone corticale par rapport à la zone médullaire de la même gonade.

Pour la gonade droite les valeurs de ce rapport sont données dans le tableau n° 28. Dans tous les cas ce rapport est inférieur à 1, montrant ainsi qu'entre 4 1/2 et 6 jours la zone corticale est moins marquée que la zone médullaire, dans les deux sexes. La valeur moyenne du rapport est plus élevée, à 5 et 6 jours, pour les testicules que pour les ovaires (0,67 et 0,59 à 5 jours ; 0,67 et 0,62 à 6 jours). On ne peut pas savoir si cette différence est aléatoire ou si elle est dûe à une incorporation de ^{3}HTdr dans la zone corticale, plus élevée dans le testicule droit que dans l'ovaire droit.

L'embryon de stade 25 a un rapport $\frac{Cx\ D}{Md\ D}$ égal à 0,83 ; nous avons déjà proposé une explication pour ce cas particulier dans le paragraphe 2.

Age en jours	Stade de dévelop.	OVAIRES	TESTICULES	Stade de dévelop.	Age en jours
			0,83	25	4,5
4,5	26-	0,70	0,65	26-	4,5
5	26	0,57	0,63	26	5
5	26+	0,51	0,61	26	5
5	?	0,68	0,65	27	5
5	?	0,58	0,68	27	5
			0,62	?	5
			0,81	?	5
5	Moyenne	0,59	0,67	Moyenne	
6	28	0,57	0,64	28+	6
6	29	0,67	0,75	29-	6
			0,64	29	6
			0,64	29	6
6	Moyenne	0,62	0,67	Moyenne	

TABLEAU n° 28 : $\frac{Cx\ D}{Md\ D}$ Gonade droite de l'embryon de Poulet : rapports des intensités du marquage dans la zone corticale et dans la zone médullaire.

4 - $\frac{Cx\ G}{Md\ G}$. Pour la gonade gauche le tableau n° 29 donne les valeurs du rapport du marquage de la zone corticale et de la zone médullaire.

Ce rapport est supérieur à 1 pour les gonades de 4 1/2 jours, et inférieur à 1 ensuite : 0,70 à 5 jours et 0,60 à 6 jours. Cette décroissance traduit un très net ralentissement de l'incorporation de ^{3}HTdr dans la zone corticale gauche par rapport à la zone médullaire gauche. Cette diminution du rapport $\frac{Cx\ G}{Md\ G}$ se produit simultanément à l'augmentation du rapport $\frac{Cx\ D}{Cx\ G}$. De plus, pendant cette période le rapport $\frac{Md\ D}{Md\ G}$ est constant (tableau n° 27).

L'évolution comparée de ces trois rapports est un argument pour affirmer que c'est bien la zone corticale gauche qui se distingue des autres tissus, particulièrment entre 4 1/2 et 5 jours : son marquage, fort à 4 1/2 jours, diminue plus que celui de la zone médullaire gauche ou de la zone corticale droite.

C. INTERPRETATION ET DISCUSSSION.

Les résultats des mesures de marquage sont considérés comme des estimations de la prolifération cellulaire. Cette équivalence n'est exacte qu'à certaines conditions. La première est la proportionalité rigoureuse entre l'incorporation de ^{3}HTdr et la synthèse d'ADN. Nous avons déjà discuté cette question. La seconde est l'absence de nécrose ou de migration cellulaire. Nous ne savons rien à ce sujet et nous ne pouvons ni exclure l'incidence de tels phénomènes sur la croissance ni en tenir compte, faute de savoir les déceler et les mesurer.

La synthèse d'ADN, mesurée par le marquage sur toute la coupe,est plus forte à droite qu'à gauche dans les gonades de Poulet de 5 et 6 jours (tableau n° 24) et de Canard de 6 et 7 jours (tableau n° 25). Nous avons vu précédemment que cette mesure avait les dimensions d'un taux par unité de volume. La différence entre les deux gonades est

Age en jours	Stade de dévelop.	OVAIRES	TESTICULES	Stade de dévelop.	Age en jours
			1,30	25	4,5
4,5	26-	1,18	0,91	26-	4,5
5	26	0,81	0,68	26	5
5	26+	0,62	0,83	26	5
5	?	0,67	0,63	27	5
5	?	0,66	0,86	27	5
			0,75	?	5
			0,58	?	5
5	Moyenne	0,69	0,72	Moyenne	
6	28	0,64	0,67	28+	6
6	29	0,51	0,72	29-	6
			0,50	29	6
			0,53	29	6
6	Moyenne	0,58	0,60	Moyenne	

TABLEAU n° 29 : $\frac{\text{Cx G}}{\text{Md G}}$
Gonade gauche de l'embryon de Poulet : rapports des intensités du marquage de la zone corticale à la zone médullaire.

en moyenne de 20 à 30 % quel que soit l'âge ou le sexe des embryons. Ce résultat est à rapprocher de la mesure du taux de la synthèse de l'ADN rapportée aux protéines (tableaux n°18 et 21) chez le Poulet de 6 jours et le Canard de 7 jours. Ce taux montre une différence de 20 % en moyenne entre les deux gonades, en faveur de la droite. Nous ne disposons pas des données nécessaires pour relier ces deux types de mesures, mais

nous constatons la convergence de leurs résultats qui peut provenir de l'évolution parallèle du contenu en protéines de la gonade et de son volume.

Pourquoi, dans ces conditions ne retrouve-t-on pas sur les coupes de gonades de Poulet de 6 jours et de Canard de 7 jours, les différences dépendant du sexe mises en évidence par le taux de la synthèse d'ADN rapportée aux protéines ? Ces différences ont été trouvées en comparant entre elles les valeurs de ces taux de synthèse. Mais le rapport du taux de synthèse de la gonade droite à celui de la gonade gauche ne diffère pas selon le sexe. Ce rapport est égal dans les embryons des deux sexes pour le Poulet de 5 2/3 jours et le Canard de 7 jours (voir les valeurs des tableaux n° 18 et 21). De même le rapport du marquage (mesuré sur coupe) de la gonade droite à celui de la gonade gauche est égal chez le mâle et chez la femelle. Il n'y a donc pas de contradiction entre ces deux séries de mesures, et il n'est pas surprenant de ne pas retrouver les différences précoces qui ne sont pas décelables dans ces conditions de mesures. Cette dernière remarque s'applique aussi aux gonades de l'embryon de Poulet de 5 jours dans lesquelles nous ne pouvons mettre en évidence de différence entre les sexes sans pouvoir cependant affirmer qu'il n'y en a pas.

Si les mesures de marquage sont insuffisantes sur ce point, elles permettent cependant de confirmer la supériorité de la synthèse d'ADN dans la gonade droite et de montrer que ce phénomène est commencé dès 5 jours d'incubation (stade 27), c'est-à-dire un jour plus tôt que nos précédentes mesures le situaient dans le développement.

Le rapport $\frac{Cx\ D}{Cx\ G}$ dont la valeur est inférieure à 1 pour les gonades de 4 1/2 jours montre que, pour un même volume de tissu, la

synthèse d'ADN est la plus élevée dans la zone corticale de la gonade gauche. Une prolifération cellulaire plus importante à gauche qu'à droite se prépare donc vers le stade 25 dans la zone corticale. Nous savons que cette inégalité cesse à 5 jours ($\frac{Cx\ D}{Cx\ G} = 1$) mais nous ne connaissons pas le moment de son apparition. Il est intéressant de remarquer le décalage d'une demi- journée entre cette dissymétrie décelée par nos mesures et celle qui a été observée par divers auteurs dans l'épaisseur de l'épithélium germinatif des gonades de 5 jours (VENZKE, 1954 ; Em. WOLFF et PINOT, 1961 ; STAHL et CARLON, 1973). Il est très vraisemblable que ce délai est nécessaire pour que la synthèse d'ADN apparaisse au niveau cellulaire et soit observable au microscope.

A 5 jours les deux zones corticales ont une synthèse d'ADN égale : $\frac{Cx\ D}{Cx\ G} = 1$, tandis que la zone médullaire droite l'emporte déjà sur la gauche. Puis à 6 jours la zone corticale droite dépasse la zone corticale gauche pour la synthèse d'ADN. La poussée de cordons sexuels primaires que la plupart des auteurs situent entre 5 1/2 et 6 1/2 (SWIFT, 1916 ; VENZKE, 1954 ; Em. WOLFF et PINOT, 1961; BISHOP-CALAME, 1966 ; STAHL et CARLON, 1973) est donc préparée dans la zone corticale par une synthèse d'ADN dont le taux par unité de volume baisse plus à gauche qu'à droite entre 5 et 6 jours.

Ce résultat s'accorde assez mal avec une intense poussée de cordons sexuels à gauche et à droite. Nos mesures montrent que la prolifération de l'épithélium germinatif a bien lieu entre 4 1/2 et 6 jours ; mais cette activité semble trop limitée pour réaliser l'envahissement de la zone médullaire par ces cordons sexuels primaires.

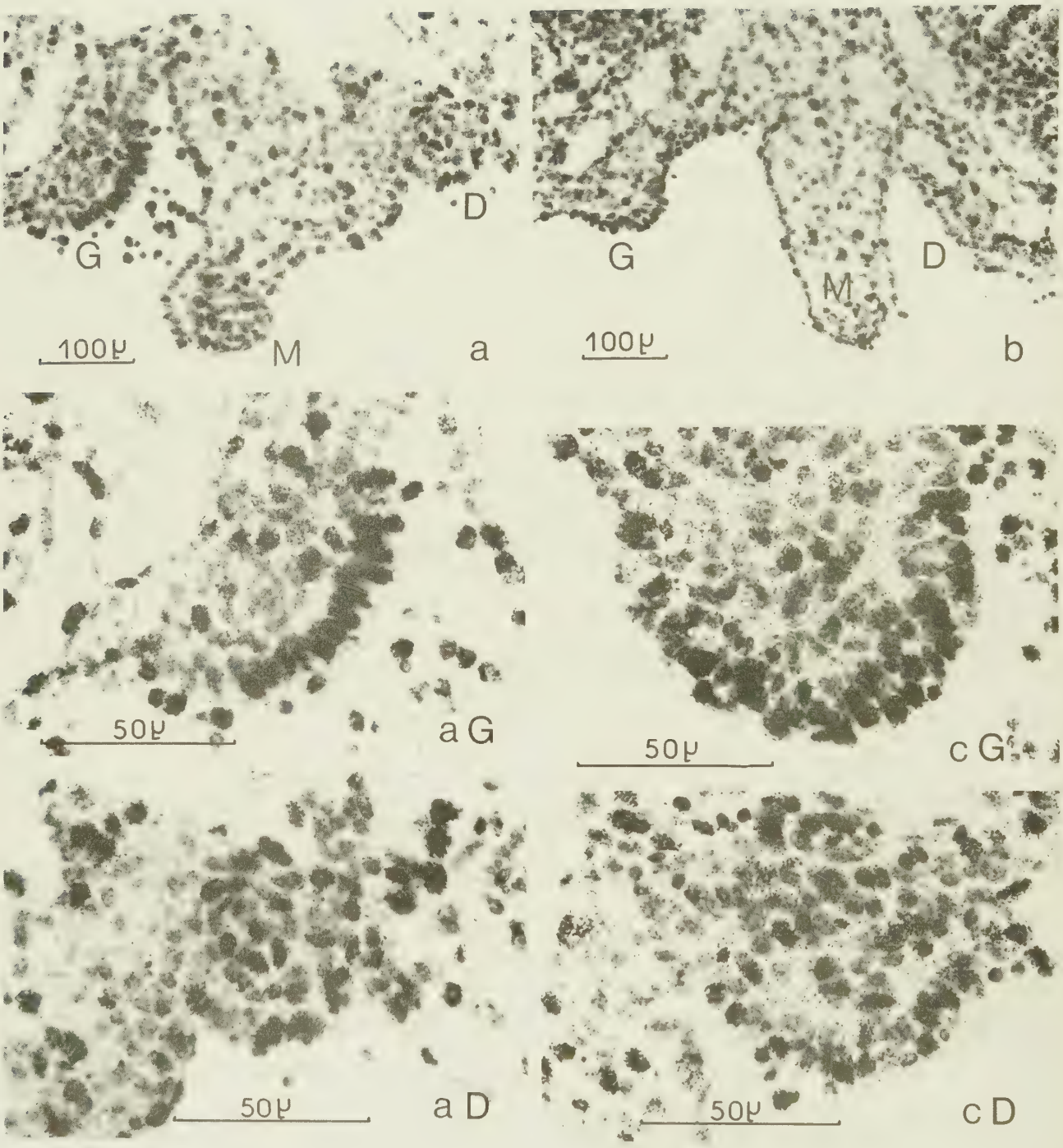
Cette conclusion se trouve confirmée par la comparaison du marquage dans la zone corticale et dans la zone médullaire (rapports $\frac{Cx\ D}{Md\ D}$ et $\frac{Cx\ G}{Md\ G}$). La zone médullaire se marque plus que la zone corticale,

sauf à 4 1/2 jours dans la gonade gauche (tableaux n° 28 et 29). On peut donc dire que pendant cette période la zone médullaire prolifère plus activement que la zone corticale sauf dans la gonade gauche de 4 1/2 jours. Il donc vraisemblable que la zone médullaire réalise une grande partie de la croissance des gonades pendant cette période. Cette conclusion s'oppose à celle des auteurs qui voient dans la poussée de cordons sexuels primaires, d'origine épithéliale (c'est-à-dire corticale), la cause de la forte croissance de la gonade pendant cette période. C'est seulement dans la gonade gauche de 4 1/2 jours que la zone corticale peut jouer un rôle important dans la croissance, à cause de son taux de synthèse d'ADN plus élevé que dans la zone médullaire. Il est probable que cette particularité est à l'origine de la dissymétrie de la zone sous corticale que nous étudierons dans le prochain paragraphe.

II. LOCALISATION DE LA SYNTHESE D'ADN DANS LES GONADES

Les observations développées dans ce paragraphe ont pour but d'illustrer les mesures précédentes. Les détails de la répartition du marquage entre les différents tissus, l'importance de la zone sous-corticale non marquée dont il n'a pas été tenu compte précédemment, et d'autres particularités du marquage complèteront nos résultats antérieurs et nous aideront à mieux comprendre l'histogenèse des gonades entre 4 1/2 et 6 jours.

Pour effectuer ces observations nous avons repris les mêmes embryons qu'au paragraphe I, auxquels nous en avons ajouté de nouveaux, notamment pour les stades jeunes, et nous avons cherché, coupe par coupe, ce qui dans la localisation du marquage était particulier à l'une ou l'autre gonade. Ensuite nous avons rapproché ces observations des mesures précédentes pour confronter notre interprétation de ces


G
D
M
100µ
a
G
M
D
100µ
b
50µ
a G
50µ
c G
50µ
a D
50µ
c D

résultats avec les descriptions de l'histogenèse gonadique proposées par les autres auteurs.

1 - Embryons de 4 1/2 jours ; Stade 24- à 26- (voir les photos de la fig. 26). Les deux gonades de l'embryon de Poulet de 4 1/2 jours sont fortement dissymétriques. Cela se traduit par une inégalité de la surface des coupes et de la longueur des gonades. Cet écart est toujours en faveur de la gonade gauche.

La densité de marquage de la gonade gauche est supérieure à celle de la gonade droite. La zone corticale gauche est souvent fortement marquée tandis qu'elle l'est peu à droite. De même, dans la zone médullaire la densité de noyaux marqués est plus grande à gauche qu'à droite, surtout dans les embryons de stade 24 et 25. Dans quelques coupes on voit apparaître une zone non marquée entre les zones corticale et médullaire de la gonade gauche.

Figure 26 : Gonades de Poulet de 4,5 jours.

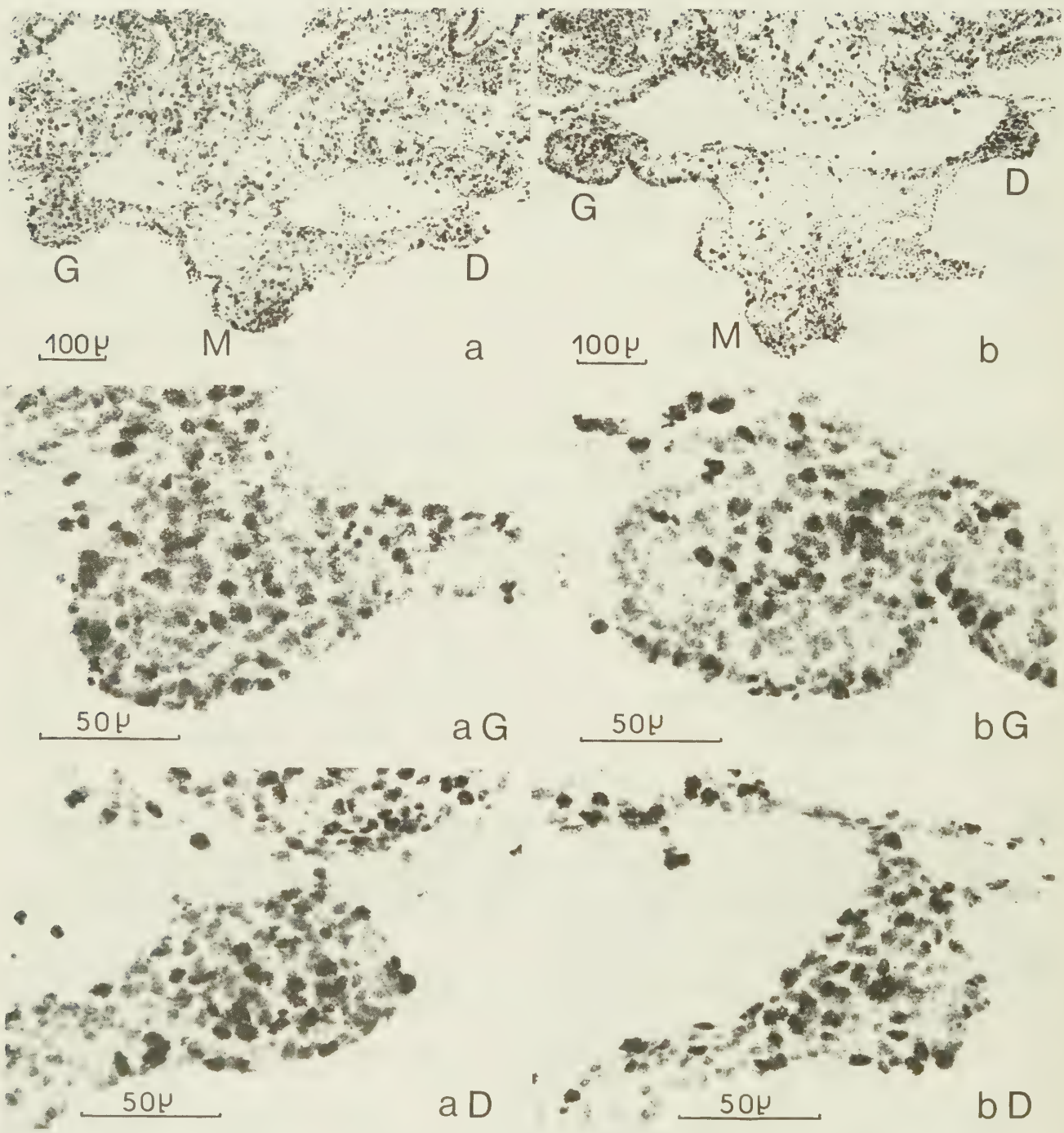
a) Coupe d'embryon ♂ (Stade 25) ; les testicules gauche (G) et droit (D) sont situés de part et d'autre du mésentère (M).

aG. Détail de la photo a. Testicule gauche. L'épithélium germinatif est très fortement marqué.

aD. Détail de la photo a. Testicule droit. L'épithélium germinatif est faiblement marqué.

b) Coupe d'embryon ♀ (Stade 26-). Sur cette coupe très postérieure dans l'embryon l'ovaire droit (D) a presque disparu, tandis que l'ovaire gauche (G), assez volumineux a un épithélium germinatif très marqué.

cG et cD. Coupes d'ovaires gauche et droit (même embryon que la photo b, mais à un niveau plus antérieur). Dans l'ovaire gauche (cG) l'épithélium germinatif est épais et bien marqué.


G
D
100µ
M
a
G
D
M
100µ
b
50µ
a G
50µ
b G
50µ
a D
50µ
b D

2 - Embryons de 5 jours ; Stade 26 et 26+ (voir les photos de la fig. 27).

La dissymétrie morphologique est toujours très nette. Cependant nos observations ne sont pas suffisantes pour déceler une différence entre 4 1/2 et 5 jours, ou entre les embryons des deux sexes. La zone corticale gauche est plus épaisse que la droite, qui apparaît comme un simple épithélium bordant la zone médullaire.

Cette zone médullaire droite est fréquemment plus marquée que la gauche. Elle occupe la plus grande partie de la coupe puisque la zone corticale est très aplatie, et que la zone sous corticale est peu développée. Au contraire la zone médullaire gauche laisse,de plus en plus souvent, entre elle et la zone corticale une bande de tissu de quelques cellules d'épaisseur qui se caractérise par l'absence ou la faiblesse du marquage. A 5 jours cette zone sous-corticale n'est pas présente sur toutes les coupes et sa largeur est très variable. Cette zone contient de nombreux gonocytes.

Figure 27 : Gonades de Poulet de 5 jours.

a) Coupe d'embryon ♂ (Stade 26). Les testicules gauche (G) et droit (D) sont situés de part et d'autre du mésentère (M) qui été sectionné.

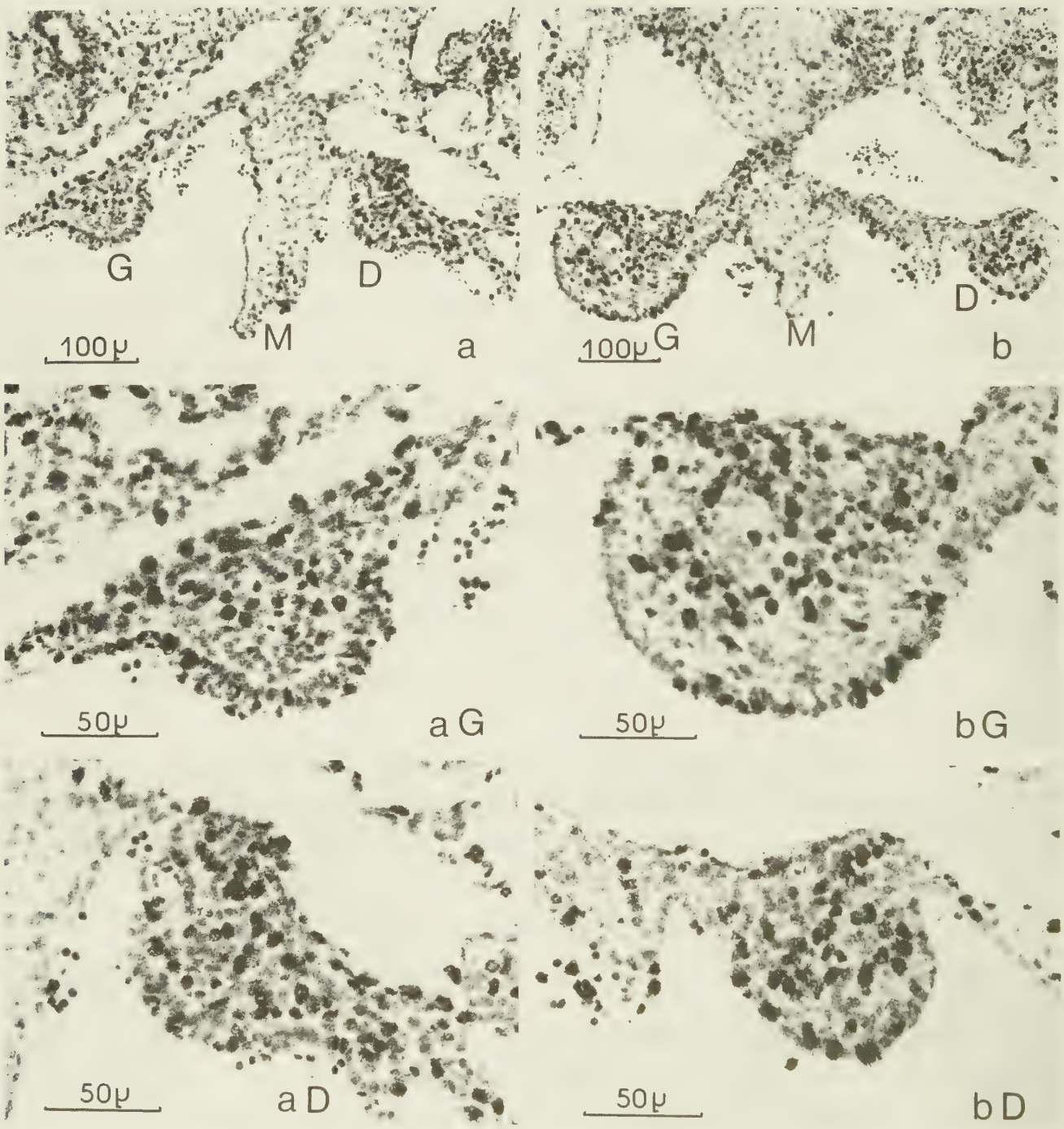
aG. Détail de la photo a : testicule gauche. La zone sous-corticale est présente entre l'épithélium germinatif et la zone médullaire.

aD. Détail de la photo a : Testicule droit.

b) Coupe d'embryon ♀ (Stade 26+). Les ovaires gauche (G) et droit (D) sont situés de part et d'autre du mésentère sectionné (M).

bG. Détail de la photo b : Ovaire gauche. La zone sous-corticale est bien développée.

bD. Détail de la photo b : Ovaire droit. La zone sous-corticale est peu visible, et le marquage de la zone médullaire est intense.


G
D
M
100µ
a
G
M
D
100µ
b
50µ
a G
50µ
b G
50µ
a D
50µ
b D

3 - Embryons de 6 jours ; Stade 28 et 28+ (voir les photos de la fig. 28).

A 6 jours la zone corticale est plus épaisse à gauche qu'à droite. A droite elle se limite à un épithélium mince, épaissi seulement par endroits. A gauche la zone corticale apparaît plus épaisse et bourrée de noyaux. Cette densité est d'autant plus remarquable que la zone sous-corticale immédiatement voisine semble pauvre en noyaux. Le marquage de la zone corticale gauche est relativement moins dense que celui de la zone médullaire. Entre ces deux zones s'étend maintenant dans toutes les coupes une zone sous-corticale peu ou pas marquée, riche en gonocytes et dont l'épaisseur est variable. Généralement la zone médullaire gauche occupe au moins la moitié de la surface des coupes.

A droite, la zone médullaire dont la densité de marquage est forte, occupe une partie importante de la coupe. On distingue parfois une zone sous-corticale non marquée bordant une zone corticale plus étroite qu'à gauche.

Figure 28 : Gonades de Poulet de 6 jours.

a) Coupe d'embryon ♂ (Stade 28). Les testicules gauche (G) et droit (D), situés de part et d'autre du mésentère (M), ont une surface de coupe presque égale.

aG. Détail de la photo a : testicule gauche dans lequel la zone sous-corticale non marquée est bien visible.

aD. Détail de la photo a : testicule droit.

b) Coupe d'embryon ♀ (Stade 28). La surface de coupe de l'ovaire gauche (G) est très supérieure à celle de l'ovaire droit (D).

bG. Détail de la photo b : ovaire gauche avec une zone sous-corticale très nette.

bD. Détail de la photo b : ovaire droit.

III. CROISSANCE ET HISTOGENESE DES GONADES ENTRE 4 1/2 ET 6 JOURS.

Pendant la période qui s'étend de 4 1/2 à 6 jours (stades 24 à 28) les gonades sont le siège d'une intense prolifération cellulaire, qui se manifeste par un fort accroissement du volume. L'étude histologique rapide confirme cette observation et la précise un peu : cette croissance affecte la zone médullaire et la zone corticale de la gonade gauche, mais elle affecte peu la zone corticale de la gonade droite qui reste étroite et aplatie à 6 jours. Une étude histologique plus détaillée a conduit plusieurs auteurs à décrire la formation de cordons sexuels primaires et à proposer une explication de leur rôle dans l'histogenèse et la différenciation des gonades (FIRKET, 1914 ; SWIFT, 1916 ; WILLIER, 1939 ; HAMPE, 1950 ; VENZKE, 1954 ; GALLIEN, 1957 ; Em. WOLFF et PINOT, 1961 ; BISHOP-CALAME, 1966). Ces massifs cellulaires en forme de cordons apparaissent à 5 1/2 jours comme des bourgeons formés par la prolifération de l'épithélium germinatif et pénètrent dans le stroma. L'association étroite de ce stroma mésenchymateux et des cordons de cellules d'origine épithéliale est, d'après ces auteurs, le mode de formation de la zone médullaire dans les deux gonades entre 5 1/2 et 6 1/2 jours.

VENZKE écrit à propos de l'embryon de 6 jours : "Much of the gonad is composed of cords of cells, which lie close together and are separated from one another by a few stroma cells". Cet auteur, qui d'après nous reflète assez bien l'opinion généralement admise depuis SWIFT, donne une place prépondérante à la poussée de cordons sexuels primaires dans l'histogenèse de la gonade entre 5 et 6 jours.

Nos résultats sont difficilement compatibles avec cette description du développement gonadique. La synthèse d'ADN qui est très forte à 4 1/2 jours dans la zone corticale gauche ne cesse de décroî-

tre jusqu'à 6 jours par rapport à la zone médullaire gauche (tableau n° 29).

A aucun moment, dans la gonade droite, la zone corticale ne dépasse la zone médullaire pour la synthèse d'ADN (tableau n° 28). Dans ces conditions il semble peu probable que la poussée de cordons sexuels primaires d'origine corticale prenne une place prépondérante dans le développement de la gonade à 5 1/2 et 6 jours. Au contraire nous avons vu que la zone médullaire, tant à gauche qu'à droite est le siège d'une synthèse d'ADN intense et continue entre 4 1/2 et 6 jours. Ceci désigne la zone médullaire comme principale responsable de la croissance gonadique pendant cette période. C'est ce que VENZKE a constaté à 5 jours: "The gonadal mesenchyme or stroma which lies beneath the germinal epithelium, is increasing rapidly.....the stroma, which composes a greater part of the gonads, is more voluminous in the left that in the right gonad". Mais nous avons vu que, selon cet auteur, tout est modifié par la poussée des cordons sexuels primaires qui envahissent le stroma.

Dans un travail plus récent STAHL et CARLON (1973) ont repris l'étude de l'histogenèse de la gonade embryonnaire de Poulet. Par des techniques histologiques variées ils ont obtenu des résultats qui les conduisent à donne une nouvelle interprétation de cette histogenèse.

Cette interprétation diffère par deux points principaux de celle des autres auteurs. D'une part ils attribuent une place prépondérante à la zone médullaire, organisée en cordons, dans la croissance des deux gonades. D'autre part ils limitent l'intrusion des cordons sexuels d'origine épithéliale dans la zone médullaire à la pénétration

de quelques cellules somatiques et gonocytaires. Nos résultats confirment le premier point en montrant la prolifération active de la zone médullaire tant à gauche qu'à droite pendant toute cette période. Nous ne pouvons discuter le second point qui échappe à nos résultats et à nos observations. Nous constatons seulement l'analogie entre la zone de "transition sous-épithéliale" de STAHL et CARLON et la zone sous-corticale observée sur nos préparations. Cette zone, d'origine épithéliale probable, correspond par sa localisation à la partie basale ou proximale des cordons sexuels primaires décrits par les autres auteurs. Elle est caractérisée, d'après nos observations, par l'absence ou la faiblesse du marquage. D'autre part, elle est riche en gonocytes, et les noyaux somatiques y sont moins abondants que dans les zones corticale et médullaire. La partie distale des cordons est d'origine médullaire d'après l'hypothèse de STAHL et CARLON.

Nous pouvons maintenant proposer une interprétation de nos résultats qui s'appuie sur le schéma classique de la formation des gonades mais inclut aussi les nouvelles données de STAHL et CARLON.

A 4 1/2 jours les gonades sont fortement dissymétriques. L'épithélium germinatif est plus épais dans la gonade gauche, et la zone médullaire y est plus volumineuse. Le taux de synthèse de l'ADN est plus élevé à gauche qu'à droite dans l'épithélium germinatif et probablement aussi dans la zone médullaire. Cela se traduit à 5 jours par une zone corticale gauche épaisse, doublée par endroits d'une zone sous-corticale, et par une zone corticale droite aplatie, le plus souvent en contact direct avec la zone médullaire puisque la zone sous-corticale est encore très peu développée. La zone médullaire des deux gonades s'accroît beaucoup entre 4 1/2 et 5 jours, et conser-

ve son caractère dissymétrique.

Entre 5 et 6 jours la zone corticale gauche continue sa prolifération mais de moins en moins activement. La zone sous-corticale gauche s'accroît peu par rapport à la zone médullaire. Pendant le même temps les zones corticale et médullaire de la gonade droite prolifèrent activement. La zone corticale donne naissance à une petite zone sous-corticale, et la zone médullaire s'accroît, occupant ainsi à 6 jours la majeure partie de la gonade droite.

A 6 jours la gonade est donc constituée de trois parties distinctes : la zone corticale, la zone sous-corticale et la zone médullaire. Les zones corticale et sous-corticale sont, proportionnellement à l'ensemble de la gonade, plus développées à gauche qu'à droite. La synthèse d'ADN presque nulle dans la zone sous-corticale, est relativement plus forte dans la zone médullaire que dans la zone corticale.

La zone sous-corticale, dont la localisation sur les coupes est la même que la zone de transition sous-épithéliale de STAHL et CARLON, recouvre la partie basale des cordons. La forte croissance de la zone médullaire que nous mesurons et l'organisation cordonnale de cette même zone que décrivent STAHL et CARLON sont deux arguments en faveur de l'origine médullaire de la partie apicale des cordons sexuels primaires. Nous ne pouvons évidemment pas exclure des mouvements cellulaires entre la zone sous-corticale et la zone médullaire mais nous pensons que, jusqu'à 6 jours, leur importance relative dans l'histogenèse de la gonade est limitée.

Nous n'avons pas encore envisagé, dans cette interprétation de nos résultats, l'origine des différences entre ovaires et testicules. Ces différences existent puisque nous les avons mises en

évidence à 6 jours par d'autres moyens. Elles ne sont pas décelables par les techniques utilisées dans cette partie du travail pour des raisons que nous avons déjà exposées. On peut cependant supposer qu'elles portent principalement sur les taux de croissance et sur le degré d'asymétrie des constituants de la gonade avant 6 jours. Mais, comme nous l'avons déjà mentionné, d'autres remaniements histologiques non symétriques peuvent intervenir, telles que des nécroses ou des mouvements cellulaires. Tous ces phénomènes, difficiles à déceler avec certitude et à mesurer avec précision, peuvent contribuer à la formation de gonades morphologiquement et histologiquement très différentes à partir d'ébauches apparemment semblables.

Pour finir nous devons remarquer la rapidité avec laquelle ces mécanismes évoluent. En quelques heures les taux varient considérablement, changeant ou inversant l'orientation prise auparavant. L'histogenèse de la gonade est la résultante de tous ces mécanismes dont les effets s'additionnent ou se compensent suivant les fluctuations de leur intensité. Seuls quelques uns de ces mécanismes nous sont accessibles et la mesure que nous pouvons en faire manque encore de précision. C'est pourquoi des aspects importants de l'histogenèse échappent encore à notre investigation.

Ainsi, l'interprétation que nous avons donnée de nos résultats ne permet pas d'expliquer comment une zone corticale isolée, sans zone médullaire, peut reconstituer une gonade complète (WOLFF et HAFFEN, 1959 ; HAFFEN, 1963). On peut seulement avancer l'idée que cette zone médullaire néo-formée est composée de cellules d'origine épithéliale, qui constituent normalement la zone sous-corticale. Cette zone médullaire est donc incomplète et le problème de l'origine des cellules sécrétrices d'hormones est à nouveau posé. Cette question, très controversée, n'a pas de réponse dans le cadre de nos résultats.

En conclusion de cette étude de la synthèse d'ADN dans les gonades entre 4 1/2 et 6 jours nous pouvons dire que nous n'avons pas atteint notre premier objectif. Nous n'avons pas démontré l'existence de différences entre les gonades mâles et femelles. Pourtant nous savons que ces différences existent à 6 jours. D'autres techniques plus fines et plus appropriées seront nécessaires pour résoudre cette question. Dans l'étude de l'histogenèse, qui était notre second objectif, nous avons apporté des éléments nouveaux sur la synthèse d'ADN et la prolifération cellulaire dans les gonades. Ces résultats, mesures et observations, apportent des données intéressantes pour la description de l'histogenèse et de la différenciation des gonades.

C O N C L U S I O N G E N E R A L E

D I S C U S S I O N

Pour conclure ce travail nous voulons résumer, parmi les résultats obtenus, ceux qui apportent des éléments nouveaux dans la description et l'explication des premières étapes de la différenciation sexuelle embryonnaire.

Dans la première partie nous avons montré que les embryons mâles contiennent plus de protéines et plus d'ADN que les embryons femelles. Cette différence existe à 7 jours chez le Poulet et à 8 jours chez le Canard. Il n'est pas exclu qu'elle s'établisse 1 ou 2 jours plus tôt. Nous ne savons pas s'il existe un rapport entre cette différence et celle que nous observons entre les gonades de sexes opposés pendant la même période. En particulier nous ne savons pas si une influence hormonale peut intervenir à cet âge sur la croissance du corps entier de l'embryon. Cependant, ce résultat prouve que, au moment où le sexe phénotypique des gonades apparait, le corps entier de l'embryon porte déjà la marque de son sexe génétique.

Parmi les résultats des mesures sur le contenu en protéines et en ADN des gonades, exposés dans la deuxième partie, ceux qui montrent des différences entre les gonades suivant leur sexe et leur latéralité présentent un intérêt particulier.

Chez le Poulet (6 jours) et le Canard (7 jours) la gonade gauche contient plus de protéines que la gonade droite du même embryon, et le testicule plus que l'ovaire du côté homologue dans deux embryons de sexe différent. Aux mêmes âges les quantités d'ADN diffèrent aussi. L'ovaire gauche contient 2 à 2,5 fois plus d'ADN que l'ovaire droit,et les testicules ont un contenu en ADN presqu'égal, voisin de celui de l'ovaire droit chez le Poulet et de celui de l'ovaire gauche chez le Canard. De telles différences nettement établies à ces stades (Poulet de 6 jours et Canard de 7 jours), apparaissent progressivement dans la journée qui précède, ou plus tôt encore. Ainsi MITTWOCH et coll. (1971) ont montré que,à 5 jours chez le Poulet, le volume des testicules gauche et droit est supérieur à celui des ovaires gauche et droit, respectivement, et le reste à 6 et 7 jours. L'analogie avec nos résultats sur le contenu en protéines des gonades est très grande et suggère une relation entre ce contenu en protéines et le sexe des gonades, à un âge où la mesure des protéines se heurte à des difficultés techniques actuellement insurmontables.

Les taux de la synthèse d'ADN rapportée à la quantité de protéines ou à la quantité d'ADN, dont les valeurs sont données dans la troisième partie, confirment les différences établies par les contenus en protéines et en ADN. Dès 6 jours chez le Poulet et 7 jours chez le Canard les taux de synthèse caractèrisent chaque type de gonade. Ces différences, comme celles affectant les contenus en protéines et en ADN des gonades, s'établissent avant le stade où nous les mesurons. Dans la quatrième partie nous avons essayé de montrer, par la mesure

du marquage sur coupe, l'existence de ces différences avant 6 jours chez le Poulet. A $4\frac{1}{2}$ jours et à 5 jours nous ne mesurons pas de différence entre ovaires et testicules. Nous ne retrouvons pas non plus dans les gonades de Poulet de 6 jours les différences entre mâle et femelle que nous venons de décrire. Nous pensons que ce résultat s'explique par la nature même des mesures réalisées au microphotomètre, et ne doit donc pas être interprété contre la conclusion de la troisième partie. La possibilité d'une différenciation sexuelle des processus de croissance, plus précoce que nous l'avons montrée, persiste malgré ce résultat.

Ces mêmes séries de mesures de la synthèse d'ADN sur les coupes de gonades, complètées par l'examen direct des coupes, ont apporté des données intéressantes sur l'histogénèse des gonades de Poulet de $4\frac{1}{2}$ à 6 jours. La comparaison de la synthèse d'ADN dans les zones corticale et médullaire d'une même gonade ou des deux gonades d'un même embryon exclut l'hypothèse d'une participation prépondérante de la zone corticale à la formation de la gonade de 6 jours. La zone médullaire prolifère plus que la zone corticale à 5 et 6 jours et doit donc être responsable d'une part importante de la croissance pendant cette période. Dans ces conditions, il semble nécessaire de reconsidèrer l'importance du rôle généralement attribué aux cordons sexuels primaires dans l'histogénèse de la gonade.

Les résultats que nous avons résumés sont autant de signes d'un assujettissement des processus de croissance au sexe génétique de l'embryon, notamment en ce qui concerne la

croissance des gonades. Ces signes, ces caractères sexuels, nous les décelons bien avant la seconde poussée de cordons sexuels qui établit définitivement la nature ovarienne de la gonade gauche femelle. Nous les décelons aussi avant les différences de secrétion hormonale dans les gonades de sexes opposés. Ce point, d'importance décisive, ne peut être affirmé sans réserve car la chronologie de la mise en place de la fonction secrétrice est encore mal connue. Des nombreux travaux sur la secrétion hormonale précoce et ses voies métaboliques de synthèse dans les gonades (GALLIEN et LE FOULGOC,1957;WOLFF et coll., 1966; SCHEIB et HAFFEN,1968;WENIGER,1974 et voir la bibliographie détaillée dans SCHEIB et HAFFEN,1974) on peut conclure actuellement que la différenciation sexuelle hormonale est réalisée chez le Poulet entre 6 et 7 jours. On peut donc admettre provisoirement que la différenciation sexuelle de la croissance précède d'un journée au moins celle de la secrétion hormonale.

Un autre signe de différenciation phénotypique, apparaissant avant ceux que nous venons de mentionner, a été décelé par Van LIMBORGH dans les gonades de Poulet (1968a) et de Canard (1968b): le degré d'asymétrie gauche-droite de la répartition gonocytaire est différent dans les embryons de sexes opposés dès 4 jours chez le Poulet et 5 jours chez le Canard. Le même auteur a montré que cette différence porte principalement sur la population gonocytaire de la zone corticale.

La théorie hormonale de la différenciation du sexe (WILLIER,1939;WITSCHI,1950;WOLFF,1965) soumet les caractères sexuels phénotypiques à l'influence des hormones. Celles-ci ont un effet morphogène qui est prouvé par le développement

de la zone corticale d'une gonade mâle placée en milieu hormonal femelle. Pourtant, les caractères sexuels que nous observons dans les gonades avant la différenciation sexuelle de la secrétion hormonale semblent échapper au moment de leur apparition à l'influence des hormones. Nous sommes donc amenés à nous interroger sur la nature des liens qui existent entre les différents caractères précoces de différenciation que nous connaissons.

Nous proposons l'explication suivante qui nous semble apporter une réponse satisfaisante à cette question. Chaque caractère sexuel se différencie à l'origine de façon autonome. La convergence de tous ces caractères, qui expriment chacun pour leur part le sexe de l'embryon, a pour résultat la formation de gonades sexuellement différenciées. La secrétion hormonale est l'un de ces caractères qui, après s'être différencié selon le sexe, a le rôle morphogène et organisateur que l'on connait. La différenciation sexuelle des gonades se décompose donc en un certain nombre de signes dont le dénominateur commun est le sexe génétique.Ces signes établissent progressivement des liens de dépendance réciproque et deviennent ainsi définitifs et irréversibles.

Cette présentation des liens entre les divers signes de la différenciation du sexe nous semble en accord avec les connaissances que nous avons actuellement sur ce phénomène. Elle nous a été suggérée par nos propres résultats, et nous espèrons ne pas avoir surestimé la signification de ceux-ci en les interprétant, comme nous avons essayé de la faire, dans un cadre élargi.

R E S U M E

Le degré d'asymétrie morphologique des gonades est le signe le plus marqué du sexe des embryons d'oiseaux. Les deux testicules sont presque symétriques tandis que l'ovaire gauche est beaucoup plus volumineux que le droit. Cette différence devient particulièrement sensible au moment où se produit dans l'ovaire gauche la seconde poussée de cordons sexuels (à 8 jours chez le Poulet et 9 jours chez le Canard). L'intérêt porté à cet aspect de la différenciation est justifié par la facilité de son observation, mais aussi par l'importance des causes dont il dépend. La croissance inégale des gonades selon le sexe de l'embryon est l'une de ces causes.

La mesure de la croissance des gonades par le contenu en protéines et en ADN, et par le taux de synthèse d'ADN était notre premier objectif. Au cours de cette étude il nous est apparu que la croissance corporelle pouvait elle aussi dépendre du sexe. C'est donc un ensemble de résultats quantitatifs portant sur l'embryon entier et sur les gonades que nous présentons, en vue d'établir ou de préciser les rapports entre la différenciation sexuelle et la croissance.

Les protéines ont été dosées par la technique de LOWRY, et l'ADN par celle de BURTON. La synthèse d'ADN a été estimée par la technique de marquage à la thymidine tritiée. L'incorporation du précurseur a été réalisé soit in vitro en culture organotypique, soit in ovo. Dans le premier cas la radioactivité incorporée a été mesurée sur un broyat d'organes précipité au TCA, dans le second cas le marquage a été mesuré sur coupe histologique à l'aide d'un microphotomètre.

La plupart des mesures ont été réalisées sur le Poulet et sur le Canard afin de montrer la généralité des résultats obtenus et de préciser certains caractères propres à l'une ou l'autre espèce.

Le sexe des embryons de Poulet de 5, 6 et 7 jours, et de Canard de 6, 7 et 8 jours a été identifié par l'examen des hétérochromosomes dans des cellules sanguines en mitose, prélevées à 4 jours (Poulet) ou 5 jours (Canard) dans la circulation extra-embryonnaire. La préparation des frottis sanguins est simple et rapide, et le déve-

loppement ultérieur des embryons normal. Le sexe des embryons plus âgés est identifié par la morphologie des gonades.

I. - Dans la première partie du travail, la croissance du corps entier de l'embryon a été mesurée par le contenu global en protéines et en ADN, chez le Poulet entre 5 et 11 jours, et chez le Canard entre 6 et 11 jours ; pour l'ADN comme pour les protéines, la croissance est de type exponentiel, mais le coefficient d'accroissement diminue avec l'âge (Tableaux 1 et 3, Fig. 4 à 9). Pendant la même période le rapport de la quantité de protéines à celle d'ADN contenue dans un embryon augmente régulièrement. Ce rapport varie de 16 à 24 pour le Poulet entre 5 et 11 jours, et de 14 à 21 pour le Canard entre 6 et 11 jours (Fig. 10). Il est égal pour les embryons des deux sexes bien que les quantités de protéines et d'ADN soient différentes chez le mâle et chez la femelle. En effet, les embryons mâles contiennent plus de protéines et plus d'ADN (+ 3% environ) que les femelles, à partir de 7 jours chez le Poulet et de 8 jours chez le Canard (Tableau 4). Cette différence pourrait même être établie un ou deux jours plus tôt.

Ce résultat prouve que, dès ces stades précoces du développement, au moment où le sexe phénotypique des gonades apparaît, le corps entier de l'embryon porte déjà la marque de son sexe génotypique.

II. - Dans la deuxième partie sont exposés les résultats des mesures de croissance réalisées sur les gonades embryonnaires. Leur contenu en protéines et en ADN augmente pendant toute la période étudiée (6 à 11 jours pour le Poulet, et 7 à 11 jours pour le Canard) quel que soit leur sexe et leur côté dans l'embryon. Des courbes de croissance en protéines et en ADN on peut retenir principalement la forme exponentielle de celles de l'ovaire gauche, et la position relative des courbes des testicules d'une part et des ovaires d'autre part. Le tracé de ces courbes est différent pour le Poulet et pour le Canard. Chez le Poulet, les courbes de croissance en protéines et en ADN des testicules sont proches de celles de l'ovaire droit, tandis que chez le Canard elles sont proches des courbes de l'ovaire gauche. Toutes les courbes sont ascendantes pendant la période étudiée. Il n'y a donc pas de régression de l'ovaire droit jusqu'à 11 jours, mais seulement une croissance plus lente que pour l'ovaire gauche.

Parmi les valeurs du contenu en protéines et en ADN, les mesures effectuées à 6 jours pour le Poulet et à 7 jours pour le Canard ont un intérêt particulier. A ces stades la quantité de protéines contenue dans une gonade gauche est supérieure à celle d'une gonade droite, dans les embryons des deux sexes, et le contenu en protéines d'un testicule gauche ou droit est supérieur à celui d'un ovaire gauche ou droit - respectivement (Tableaux 6 et 9). On peut donc affirmer que chacun des quatre types de gonades se caractérise dès ce stade par son contenu en protéines. Pour l'ADN, les mesures montrent que l'ovaire gauche de Poulet en contient à 6 jours deux fois plus que l'ovaire droit ou les testicules (Tableau 7). Chez le Canard de 7 jours, l'ovaire gauche contient autant d'ADN que les testicules et 2,5 fois plus que l'ovaire droit (Tableau 11). De ces résultats on peut tirer les conclusions suivantes :

-- les testicules de Poulet diffèrent de ceux du Canard pour les caractères que nous avons étudiés ;
-- le rapport $\frac{\text{protéines}}{\text{ADN}}$ n'est pas égal dans les quatre types de gonades au même âge (Tableaux 8 et 12) ;
-- le contenu en protéines et en ADN des gonades est caractéristique de leur sexe, dès 6 jours pour le Poulet et 7 jours pour le Canard ; nous interprétons ce résultat comme un signe de la différenciation sexuelle des processus de croissance à cet âge.

Cette dernière conclusion est confirmée par le coefficient d'allométrie de croissance des gonades et de l'embryon entier. En effet, ce coefficient (rapport du taux quotidien d'accroissement des protéines ou de l'ADN d'une gonade à celui du corps entier) prend une valeur différente pour chaque type de gonade dès le début de la période que nous avons étudiée (Tableaux 13 à 16). Ce résultat montre à nouveau que la croissance des gonades dépend de leur sexe.

III. - La quantité d'ADN synthétisée dans les gonades (Poulet de 5 2/3 à 10 jours, et Canard de 7 à 11 jours) a été estimée par l'incorporation de thymidine tritiée. Cette synthèse d'ADN est rapportée soit à une gonade, soit à la quantité de protéines ou d'ADN qu'elle contient.

La synthèse d'ADN par gonade augmente régulièrement dans les ovaires pendant la période étudiée (Fig. 20 et 23). L'augmentation est beaucoup plus rapide dans l'ovaire gauche que dans le droit. Dans les testicules l'augmentation est limitée aux deux ou trois premiers jours,

ensuite la synthèse d'ADN est constante. Dès le stade le plus jeune (5 2/3 jours chez le Poulet, et 7 jours pour le Canard) les valeurs de l'incorporation de ^{3}HTdr dans l'ADN par gonade sont caractéristiques du sexe de celle-ci : plus élevées dans les testicules que dans les ovaires (Tableaux 17 et 20).

Le taux de la synthèse d'ADN rapportée aux protéines contenues dans les gonades diminue pendant toute la période où nous l'avons mesurée (Tableaux 18 et 21). Le taux de la synthèse rapportée à l'ADN diminue aussi, sauf dans l'ovaire gauche de Poulet entre 5 2/3 et 6 1/2 jours (Tableaux 19 et 22) . Une représentation graphique appropriée met en évidence de façon nette la différence de décroissance du taux de synthèse d'ADN dans l'ovaire gauche d'une part, et dans les testicules et l'ovaire droit d'autre part : les taux de synthèse d'ADN diminuent beaucoup moins vite dans l'ovaire gauche que dans les autres gonades (Fig. 21 et 22, 24 et 25). A cette particularité de l'ovaire gauche qui se manifeste au cours du développement s'ajoute l'inégalité des taux de synthèse au commencement de cette période. A 5 2/3 jours pour le Poulet et à 7 jours pour le Canard, le taux de la synthèse d'ADN rapportée aux protéines ou à l'ADN a une valeur plus faible dans l'ovaire gauche que dans les autres gonades.

L'inégalité de la synthèse d'ADN exprimée soit par gonade soit par rapport aux quantités de protéines ou d'ADN, démontre bien que la croissance des gonades est sexuellement différenciée. Cette dépendance à l'égard du sexe commence très tôt car les mesures que nous avons faites la mettent en évidence dès 5 2/3 jours chez le Poulet et 7 jours chez le Canard.

IV. - La synthèse d'ADN dans les gonades de Poulet entre 4 1/2 et 6 jours a été mesurée par l'intensité du marquage des coupes après autoradiographie. Le changement de technique de mesure, nécessité par des obstacles actuellement insurmontables, rend difficile la comparaison des nouveaux résultats avec ceux exposés dans la troisième partie. A 4 1/2 et à 5 jours nous ne mesurons pas de différence entre ovaires et testicules (Tableaux 24 à 29). Nous ne retrouvons pas non plus dans les gonades de Poulet de 6 jours les différences entre mâle et femelle que nous venons de décrire. Nous pensons que ce résultat s'explique par la nature même des mesures réalisées au microphotomètre, et ne doit donc pas être interprété contre notre conclusion de la troisième partie. La possibilité d'une différenciation sexuelle des processus de crois-

sance, plus précoce que nous l'avons montrée, persiste malgré ce résultat.

Ces mêmes séries de mesures de la synthèse d'ADN sur les coupes de gonades, complétées par l'examen direct des coupes, ont apporté des données intéressantes sur l'histogenèse des gonades. Ainsi a été mise en évidence une zone sous-corticale, située entre les zones corticale et médullaire, et caractérisée par son marquage faible ou nul. (Fig. 28). Cette zone,qui apparaît vers 5 jours (Fig. 27), est beaucoup plus développée à gauche qu'à droite. L'apparition de cette zone sous-corticale est précédée à 4 1/2 jours par le marquage intense de la zone corticale gauche (Fig. 26). Mais dès 5 jours, dans les deux gonades la zone médullaire se marque plus que la zone corticale (Tableaux 28 et 29), et la zone médullaire droite plus que la gauche (Tableau 27). Ces mesures montrent que la zone médullaire assure à 5 et 6 jours une part importante de la croissance des gonades.

Les résultats exposés dans ce résumé montrent que les processus de croissance embryonnaire sont sous la dépendance du sexe. Dans les gonades la croissance présente des différences sexuelles à un stade où, d'après nos connaissances actuelles, la sécrétion hormonale n'est pas encore différenciée. Ce résultat pose la question des relations entre la sécrétion hormonale et la croissance des gonades, et de façon plus générale que celle de la place d'une sécrétion hormonale différenciée parmi les divers signes précoces de différenciation sexuelle.

BIBLIOGRAPHIE

ADJOVI Y. et IDELMAN S. (1973). Etude pondérale de l'embryon de Poulet et de ses glandes surrénales: embryon normal et traité à l'ACTH. Arch.Anat. micr. Morph.exp., 62, 233-248.

ATHERTON R.W. et TIMIRAS P.S. (1970). Erythropoietic and somatic development in chick embryos at high altitude. Amer. J. of Physiol., 218, 75-79.

ATKIN N.B., MATTINSON G., BEçAK W. et OHNO S. (1965). The comparative DNA content of 19 species of placental mammals, reptiles and birds. Chromosoma,17, 1-10.

BACHMANN K., HARRINGTON B.A. et CRAIG J.P. (1972). Genome size in birds. Chromosoma,37, 405-416.

BEAUPAIN R. (1972). Effet des rayons X sur l'incorporation de la thymidine tritiée dans les nodules cancéreux humains maintenus en culture organotypique de longue durée. C. R. Acad. Sci., 274, 588-591.

BEROS D. (1971). Application de techniques récentes de fluorescence à l'étude des chromosomes aviaires. Mémoire de licence en sciences zoologiques; Lab. Cytogénét. Fac. Sc. Liège,

BHATNAGAR M.K. (1972). Sex chromatin in avian species. Canad. J. of Zool., 50, 619-622.

BISHOP-CALAME S. (1966). Etude expérimentale de l'organogénèse du système urogénital de l'embryon de Poulet. Arch. Anat. micr. Morph. exp., 55 suppl., 217-309.

BRANT J.W.A. (1952). Review of literature on chromosmes studies of the fowl. Poultry Science, 31, 409-417.

BRENEMAN W.R. (1941). Growth of endocrine glands and viscera in the chick. Endocrinology, 28, 946-954.

Van BRINK J.M. (1959). L'expression morphologique de la digamétie femelle chez les sauropsidés et les monotrèmes. Chromosoma, 10, 1-72.

Van BRINK J.M. et UBBELS G.A. (1956). La question des hétérochromosomes chez les sauropsidés. Oiseaux Experientia, 12, 162-164.

BURTON K. (1956). A study of the conditions and mechanisms of the diphenylamine reaction for the colorimetric estimation of DNA. Biochem. J., 62, 315-323.

CARO L.G. et Van TUBERGEN R.P. (1962). High resolution autoradiography. J. Cell Biol., 15, 173-199.

CASE J.F. (1952). Adrenal cortical-anterior pituitary relationships during embryonic life. Ann. N. Y. Acad. Sci., 55, 147-158.

CLEAVER J.E. (1967). Thymidine metabolism and cell kinetics. North Holland publishing company (Amsterdam) 259 pages.

COMINGS D.E. et MATOCCIA E. (1972). Evidence that heavy shoulder DNA may be localized to microchromosomes of birds. Exp. Cell Res., 70, 256-259.

CUCCHI C. (1969). Studio cariologico dell'anatra pekino (Anas platyrhynchos var. Pekino) (Cariotipo e endoreduplicazione dei cromosomi). Ist. Lomb., Rendiconti, cl. di Sci., 103, 41-46.

DAVIDSON J.N. et LESLIE I. (1950). A new approach in the biochemistry of growth and development. Nature, 165, 49-53.

DAVIS J.E. et GARRISON N.E. (1968). Mean weights of chick embryos correlated with the stages of HAMBURGER and HAMILTON. J. Morph., 124, 79-82.

DENDY P.P. (1968). The effects of X-rays on a human tumour growing in organo-typic culture. Europ. J. of Cancer, 4, 163-172.

DUBOIS R. et CUMINGE D. (1968). Sur l'aspect ultrastructural et histochimique des cellules germinales de l'embryon de Poulet. Ann. Hist., 13, 33-50.

FIRKET J. (1914). Recherches sur l'organogénèse des glandes sexuelles chez les oiseaux. Arch. Biol., 29, 201-351.

FREDERIC J. (1961). Contribution à l'étude du caryotype chez le Poulet. Arch. Biol., 72, 185-209.

GALLIEN L. (1957). La dissociation médullo-corticale dans l'organogénèse des glandes génitales des amphibiens et le problème des gonades vestigiales chez certains vertébrés. Rev. Suisse de Zool. 64, 655-672.

GALLIEN L. et LE FOULGOC M.-T. (1957). Détection par fluorométrie et colorimétrie des stéroides sexuels dans les gonades embryonnaires de Poulet. C. R. Soc. Biol., 151, 1088-1089.

GASC J.-M. (1973). Sur les résultats d'une technique d'identification précoce du sexe génotypique des embryons d'oiseaux. C. R. Acad. Sci., 277,1925-1928.

GASC J.-M. (1974). Les premiers signes de la différenciation sexuelle chez les oiseaux. Ann. Biol., XIII, 229-239.

GASC J.-M. (1975). Les chromosomes de la Caille. Expér. anim., 8, 57-67.

GASC J.-M. et LIEBART J.-C. (1972). Utilisation d'un milieu de culture gélosé pour les expériences d'incorporation de thymidine tritiée dans les gonades embryonnaires de Poulet. C. R. Acad. Sci., 275, 113-116.

GEE P.A. (1971). Sex chromatin in vertabrates with possible female heterogamety. Acta anatomica, 80, 127-135.

GIROUARD R.J. et HALL B.K. (1973). Pituitary-adrenal interaction and growth of the embryonic avian adrenal gland. J. exp. Zool., 183, 323-331.

GOEDBLOED J.-F. (1972). The embryonic and postnatal growth of rat and mouse. I The embryonic and early postnatal growth of the whole embryo. A model with exponential growth and sudden changes in growth rate. Acta anatomica, 82, 305-336.

GOLDSPINK D.F. et GOLDBERG A.L. (1973). Problems in the use of ^{3}H Tdr for the measurement of DNA synthesis. Biochim. Biophys. Acta, 299, 521-532.

GORECKI D. et DOMM L.V. (1972). Sex chromatin frequency in the avian amnion. Amer. Zool., 12, 213-221.

HAFFEN K. (1963). Sur l'évolution en greffes coelomiques du constituant cortical isolé des gonades femelles et intersexuées de l'embryon de Poulet. C. R. Acad. Sci., 256, 3755-3758.

HALL B.K. (1970). Response of host embryonic chicks to grafts of additional adrenal glands: I Response of host adrenal glands, gonads and kidney. Canad. J. of Zool., 48, 867-872.

HAMBURGER V. et HAMILTON H. (1951). A series of normal stages in the development of the chick embryo. J. of Morph. 88, 49-92.

HAMMAR B.O. (1964). Absence of sex differences in avian chromocenters. Hereditas, 51, 191-197.

HAMPE A. (1950). Sur la continuation de la première poussée de cordons sexuels mâles ches l'embryon de Poulet sous l'influence d'injections d'hormone femelle. Arch Anat. micr. Morph. exp., 39, 35-62.

HARTUNG M. et STAHL A. (1974). Identification du chromosome W chez la Caille japonaise Coturnix japonica. C. R. Acad. Sci. 278, 2157-60.

HUXLEY J.S. et TEISSIER G. (1936). Terminologie et notation dans la desciption de la croissance relative. C. R. Acad. Sci., 121, 934-937.

ISHIZAKI H. et KOSIN I.L. (1960). Sex chromatin in early chick embryos . Exp. Cell Res., 21, 197-200.

JEAN C. (1972). La croissance volumétrique des surrénales du foetus de Souris. C. R. Soc. Biol., 166, 1680-1684.

KOECKE H.-U. (1958). Normalstadien der Embryonalentwicklung bei der Hausente (Anas boschas domestica). Embryologia, 4, 55-78.

KRISHAN A. (1963). Mitotic and meiotic chromosomes of the domestic Duck. J. of Hered., 54, 91-95.

LAIRD A.K. (1965). Dynamics of relative growth. Growth, 29, 249-263.

LAMOTTE M. (1957). Initiation aux méthodes statistiques en biologie. Masson et Cie (Paris) 144 pages.

Van LIMBORGH J. (1968a).Le premier indice de la différenciation sexuelle des gonades chez l'embryon de Poulet. Arch. Anat. micr. Morph. exp., 57, 79-90.

Van LIMBORGH J. (1968 b).Number and distribution of the primary germ cells in early postsomite stage Duck embryos. Acta Morph. Neerl. Scand.,7, 117-144.

LINDH J. (1961). Quantitative aspects of prenatal gonad growth in albino rat and golden hamster studied by morphologic and experimental methods. Thèse. Département d'Anatomie de l'Université de LUND.

LOWRY O.H., ROSEBROUGH N.J., FARR A.L. et RANDALL R.J. (1951). Protein measurement with the Folin-phenol reagent. J. Biol. Chem, 193, 265-275.

MILLER R.A. (1938). Spermatogenesis in a sex reversed female and in normal males of the domestic fowl Gallus domesticus. Anat. Rec., 70, 155-189.

MIRSKY A.E. et RIS H. (1951). The DNA content of animal cells and its evolutionary significance. J. Gen. Physiol., 34, 451-462.

MITTWOCH U. (1971). Sex determination in birds and mammals. Nature 231, 432-434.

MITTWOCH U. et BUEHR H.L. (1973). Gonadal growth in embryo of sex reversed mice. Differentiation, 1, 219-224.

MITTWOCH U., DELHANTY J.D. et BECK F. (1969). Growth of differentiating testès and ovaries. Nature, 224, 1323-1325.

MITTWOCH U., NARAYANAN T.L., DELHANTY J.D. et SMITH C.A. (1971). Gonadal growth in the chick embryos. Nature, 231, 197-200.

MOTT C.L., LOCKMART L.M. et RIGDOM R.M. (1968). Chromosomes of the sterile hybrid Duck. Cytogenetics, 7, 403-412.

NARBAITZ R. et ADLER R. (1966). Submicroscopical observation on the differentiation of chick gonads. J. of Emb. exp. Morph., 16, 41-47.

NEEDHAM J. (1931). Chemical Embryology, Vol. 2,p.921; University Press (Cambridge). Cité par NOVIKOFF A.B. et POTTER V.R. (1948).

NEWCOMER E.H. (1957). The mitotic chromosomes in the domestic fowl. J. Hered. 48, 227-234.

NOVIKOFF A.B. et POTTER V.R. (1948). Changes in nucleic acid concentration during the development of the chick embryo. J. Biol. Chem. 173, 233-238.

NOWINSKI W.W. et YUSHOK W.D. (1953). Growth and metabolic activities in developping wings and legs of the chick embryo: I Establishment of multiplicative growth rates on the basis of DNA. Biochim. Biophys. Acta, 11, 497-506.

OGUMA K. (1938). Studies on the sauropsid chromosomes. V The karyotypes of the Quail and the Duck, different from those reported by previous authors. Annot. Zool. Japan., 17, 612-622.

OHNO S., STENIUS C., CHRISTIAN L.C., BEçAK W. et BEçAK M.L. (1964). Chromosomal uniformity in the avian subclass Carinatae. Chromosoma, 15, 280-288.

OMURA T. (1970). Prediction of sex of embryonal chick from chromosomal examination of extra embryonal blood. Caryologia, 23, 155-158.

PLAGEMANN P.G.W. et ERBE J. (1972). Thymidine transport by cultured Novikoff hepatoma cells and uptake by simple diffusion and relationship to incorporation into DNA. J. Cell Biol. 55, 161-178.

RAHIL K.S. et NARBAITZ R. (1972). Evolution of the lining bodies in the chick embryonic gonad. J. Emb. exp. Morph., 28, 133-140.

ROMANOFF A.L. (1960). The avian embryo. The Macmillan Company (New York).

ROMANOFF A.L., SMITH L.L. et SULLIVAN R.A. (1938). Biochemistry and biophysics of the developing hen's egg. III : Influence of temperature. Cornell Univ. agr. exp. Stat. Mem., 216, 1-42.

SCHEIB D. et HAFFEN K. (1968). Sur la localisation de la 3βHSDH dans les gonades de l'embryon de Poulet; apparition et spécificité de l'activité enzymatique. Ann. Embryol. Morph., 1, 61-72.

SCHEIB D. et HAFFEN K. (1974). La glande interstitelle de l'oiseau: différenciation, évolution et potentialités secrétrices. Année Biol. XIII, 197-212.

SCHMALHAUSEN I.I. (1926). Studien über Wachstum und Differnzierung. III : Die embryonale Wachstumkurve des Hünchens. W. Roux' Arch., 108, 322-387.

SCHMALHAUSEN I.I. (1926). Mem. Acad Sci. Ukr., 6, 5-48. Cité par ROMANOFF A.L. (1960).

SHOFFNER R.N., KRISHAN A., HAIDEN G.J., BAMMI R.K. et OTIS J.S. (1967). Avian chromosome methodology. Poultry Science, 46, 333-344.

SIMNETT J.D. et FISHER J.M. (1973). The relation between cell division rate and ^{3}H Tdr incorporation in organ culture. J. cell. Physiol., 81, 171-180.

SOKOLOW N.N., TINIAKOW G.G. et TROFIMOW J.E. (1934). On the chromosomes of the domestic Turkey. Zeits. Biol. (Moskaw). Cité par OGUMA K. .

SOKOLOW N.N., TINIAKOW G.G. et TROFIMOW J.E. (1936). Ueber die Morphologie der chromosomen in der Ordnung der Hühner. Zeits. Biol. (Moskaw) 5. Cité par OGUMA K. .

SOLOMON J.B. (1957). Increase of DNA and cell number during morphogenesis in the early chick embryo. Biochim. Biophys. Acta, 23, 24-27.

STAHL A. et CARLON N. (1973). Morphogénèse des cordons sexuels et signification de la zone médullaire de la gonade chez l'embryon de Poulet. Acta Anatomica, 85, 248-274.

SUZUKI K. (1930). On the chromosomes of the domestic fowl. Zool. Mag. 42, 358. Cité par YAMASHINA M.Y. .

SWIFT C.H. (1916). Origin of the sex cords and definitive spermatogonia in the male chick. Amer. J. Anat., 20, 375-410.

UNGER H. (1936). Beitrag zur Chromosomenforschung der Vögel. Zeits. Zellforsch. mikr. Anat. 25. Cité par YAMASHINA M.Y. .

VEGNI-TALLURI M. et VEGNI L. (1965). Fine resolution of the karyogramm of the Quail (Coturnix coturnix japonica). Chromosoma ,17, 264-272.

VENZKE W.G. (1943). Endocrine gland weights of chick embryos. Growth, 7, 265-271.

VENZKE W.G. (1954). The morphogenesis of the indifferent gonad of chick embryos. Amer. J. veter. Res., 15, 300-308.

VIGNERON P. (1972). Evolution postnatale de la composition corporelle globale chez le Poulet (Gallus gallus). C. R. Soc. Biol., 166, 1746-1749.

WENIGER J.-P. (1974). De la découverte du rôle des hormones sexuelles embryonnaires chez les oiseaux vers l'élucidation de leur nature chimique. Année Biol. XIII, 213-218.

WILLIER B.H. (1939). The embryonic development of sex, dans "Sex and internal secretions". Ed.: E. ALLEN (Williams and Wilkins Co).

WITSCHI E. (1950). Génétique et physiologie de la différenciation du sexe. Arch Anat. micr. Morph. exp., 39, 215-246.

WOLFF Em. et PINOT M. (1961). Stimulation du cortex de la gonade droite de l'embryon d'oiseau. Arch. Anat. micr. Morph. exp., 50, 487-506.

WOLFF Et. (1965). Problèmes généraux et problème spécial de la différenciation sexuelle. Ann. Fac. Sci. Clermont-Ferrand. 26, 17-25.

WOLFF Et. (1966). Recherches récentes sur la différenciation embryonnaire. Scientia, 7ème série, 1-11.

WOLFF Et. et HAFFEN K. (1952). Sur le développement et la différenciation sexuelle des gonades embryonnaires d'oiseaux en culture in vitro. J. exp. Zool., 119, 381-403.

WOLFF Et. et HAFFEN K. (1959). La culture in vitro de l'épithélium germinatif isolé des gonades mâles et femelles de l'embryon de Canard. Arch. Anat. micr. Morph. exp., 48bis, 331-346.

WOLFF Et., HAFFEN K. et SCHEIB D, (1966). Sur la détection et le rôle d'hormones sexuelles dans les gonades embryonnaires des oiseaux. Ann. Histochimie, 11, 353-368.

YAMASHINA M.Y. (1944). Karyotypes studies in birds: I Comparative morphology of chromosomes in 17 races of domestic fowl. Cytologia, 13, 270-296.